

Aus dem Institut für Milchkunde
der Tierärztlichen Hochschule Hannover
vorgelegt über den Lehrstuhl
für Hygiene und Technologie der Milch
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. G. Terplan

Erhebungen über den Aflatoxin M_1 -Gehalt
in Trockenmilchprodukten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Annemarie Neumann-Kleinpaul
aus Nentershausen

München 1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553803_0054

Aus dem Institut für Milchkunde
der Tierärztlichen Hochschule Hannover
vorgelegt über den Lehrstuhl
für Hygiene und Technologie der Milch
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhlinhaber: Prof. Dr. G. Terplan

Erhebungen über den Aflatoxin M_1 -Gehalt
in Trockenmilchprodukten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Annemarie Neumann-Kleinpaul
aus Nentershausen

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München



Dekan: Prof. Dr. J. Boessneck

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. H. Mahnel

Tag der Promotion: 14. Juli 1972

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATUR	2
2.1. Entdeckung der Aflatoxine	2
2.2. Bildung der Aflatoxine	3
2.2.1. Bildung der vier Grundtypen	3
2.2.2. Bildung von Aflatoxin M	6
2.3. Aufbau der Aflatoxine	8
2.4. Physikalische und chemische Eigenschaften der Aflatoxine	10
2.5. Vorkommen der Aflatoxine in Lebens- und Futtermitteln	11
2.5.1. Aflatoxine in Milch und Milchprodukten	13
2.6. Toxizität der Aflatoxine	14
2.6.1. Toxizität der Aflatoxine für den Menschen	17
2.6.2. Toxizität der Aflatoxine für landwirtschaftliche Nutztiere	17
2.7. Lebens- und futtermittelrechtliche Bestimmungen	19
2.8. Nachweismethoden	20
2.8.1. Chemische Nachweismethoden	21
2.8.2. Biologische Nachweismethoden	24
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	26
3.1. Material	26
3.2. Methode	28
3.3. Modellversuch	31
3.4. Ergebnisse	31
3.4.1. Ergebnisse aus den Untersuchungen von Trockenmilchprodukten	31
3.4.2. Ergebnisse aus dem Modellversuch	32
4. DISKUSSION	35
5. ZUSAMMENFASSUNG	41
6. LITERATURVERZEICHNIS	43

1. EINLEITUNG

Seit man 1960 in England den Zusammenhang zwischen dem Sterben von 100 000 Truthühnern und der Aufnahme verschimmelten Futters erkannte, nahm die Erforschung der bis dahin kaum beachteten Mykotoxine erheblich zu. Viele Veröffentlichungen über Mykotoxine befassen sich mit Aflatoxinen, deren Toxizität für einige Tierarten bekannt, deren Auswirkung auf die menschliche Gesundheit allerdings noch nicht abzusehen ist.

In diesem Zusammenhang interessiert, wie häufig Metaboliten der in Futtermitteln vorkommenden Aflatoxine in Milch und Milchprodukten auftreten. Mir wurde die Aufgabe gestellt, handelsübliche Trockenmilchprodukte auf ihren eventuellen Gehalt an Aflatoxin M_1 zu untersuchen. Außerdem sollte durch einen Modellversuch geprüft werden, inwieweit in der Milch vorhandene Aflatoxine auch nach der Trocknung nachweisbar sind.

2. L I T E R A T U R

2.1. Entdeckung der Aflatoxine

Wie von BORKER et al. (1966) eingehend beschrieben wurde, führten zu Beginn der sechziger Jahre Erkrankungen und Todesfälle verschiedener Tierarten nach Aufnahme verschimmelten Futters zur Entdeckung der Aflatoxine.

1961 gelang ALLCROFT et al. sowie SARGEANT et al. (1961a) die Isolierung des "toxischen Prinzips" aus für das Putensterben verantwortlichen brasilianischen Erdnüssen. Mittels Chloroform-Extraktion konnten sie einen Stoff gewinnen, der für Entenküken und Puten tödlich war und bei Puten dieselben Krankheitserscheinungen hervorrief, wie sie nach Verfütterung von brasilianischen Erdnüssen aufgetreten waren.

Die toxische Substanz erwies sich als Stoffwechselprodukt einiger Stämme von *Aspergillus flavus*, einem Schimmelpilz aus der *Aspergillus flavus-oryzae* Gruppe (SARGEANT et al., 1961b). Das Toxin wurde entsprechend Aflatoxin genannt. Dabei handelt es sich nicht um eine einheitliche Substanz, sondern um mehrere verwandte Toxine, die sich mittels Dünnschichtchromatographie trennen lassen (DE IONGH et al., 1962). Die Isolation der vier häufigsten Toxine B₁, B₂, G₁ und G₂ gelang NESBITT et al. (1962), SARGEANT et al. (1961 b) sowie VAN DER ZIJDEN et al. (1962). Als Derivate der zuerst entdeckten Toxine wurden die Aflatoxine B_{2a} und G_{2a} (DUTTON und HEATHCOTE, 1966), das aus dem Harn von Rhesus-Affen isolierte Aflatoxin P₁ (DALCZIOS, WOGAN und WEINREB, 1971) sowie die Aflatoxine M₁ und M₂ gefunden (HOLZAPFEL, STEYN und PURCHASE, 1966).

2.2. Bildung der Aflatoxine

2.2.1. Bildung der vier Grundtypen

Seit *Aspergillus flavus* als Produzent des Toxins erkannt wurde, wurden weitere Schimmelpilze auf ihre Fähigkeit zur Aflatoxinbildung untersucht. Danach sollen *Aspergillus parasiticus* (AUSTWICK und AYERST, 1963), *Penicillium puberulum* (HODGES et al., 1964), *Aspergillus ostianus* (SCOTT, WALBEEK und FORGACS, 1967) sowie verschiedene andere Aspergillen, Penicillien und *Mucor mucedo*, die aus verschimmelten Lebensmitteln isoliert wurden (HANSEN und HAGDORN, 1969), zur Aflatoxinsynthese befähigt sein. PARRISH et al. (1966) konnten allerdings keine Aflatoxin-Produktion durch *Penicillium puberulum* feststellen, und einige andere Autoren sind auf Grund ihrer Untersuchungen zu dem Schluß gekommen, daß nur *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* zur Toxinsynthese befähigt sind (MISLIVEC, HUNTER und TUTE, 1968; WILSON et al., 1968; WOGAN, 1969).

Untersuchungen hinsichtlich optimaler Bedingungen für Pilzwachstum und Toxinproduktion wurden in der Hauptsache an *Aspergillus flavus* vorgenommen. Dieser Schimmelpilz kommt ubiquitär im Boden vor und befällt daher vor allem Früchte, die im Boden reifen (KNAPSTEIN, 1967). Experimentell kann Pilzwachstum mit Aflatoxinbildung auf allen möglichen landwirtschaftlichen Erzeugnissen provoziert werden, sofern Temperatur, Feuchtigkeit und Belüftung günstig sind (HESELTINE et al., 1966). So wurden außer Erdnüssen (ASHWORTH, SCHROEDER und LANGLEY, 1965) z.B. Weizen, Mais, Sojabohnen, Hirse (CHANG et al., 1963; HESELTINE et al., 1966), Hafer (STUBBLEFIELD et al., 1967) und Reis (HESELTINE et al., 1966; SHOTWELL et al., 1966) als geeignete Substrate für die Bildung von Aflatoxin durch *Aspergillus flavus* Stämme befunden.

MATELES und ADAYE (1965) erzielten gute Toxinausbeute auf synthetischen Medien und ermittelten dabei die Toxinbildung begünstigende und hemmende Substanzen.

Aflatoxine werden in den Zellen des Mycel gebildet. Sie sind daher in erster Linie im Mycel, in geringer Menge aber auch in den Sporen nachweisbar (HANSEN, 1971). Die Ausbeute und das Verhältnis der einzelnen Aflatoxintypen zueinander sind unterschiedlich, abhängig von Pilzstamm, Substratzusammensetzung und Bedingungen für das Kulturwachstum. Normalerweise sind die Aflatoxine B₂ und G₂ in relativ geringer Menge, B₁ am reichlichsten nachweisbar (WOGAN, 1966).

Wesentlich beeinflußt werden Wachstum von *Aspergillus flavus* und Bildung von Aflatoxin durch Temperatur und Feuchtigkeit. Die günstigsten Bedingungen für das Pilzwachstum sind in tropischen Klimabereichen gegeben bei Temperaturen um 30 ° C und relativer Luftfeuchtigkeit zwischen 80 und 85 % (SPENSLEY, 1963; AUSTWICK und AYERST, 1963). SCHINDLER, PALMER und EISENBERG (1967) beobachteten nach fünf Tagen maximales Pilzwachstum bei 29 und 35° C. Nach SCHROEDER und HEIN (1967) liegt die Optimaltemperatur für das Wachstum der Pilze um 25° C.

Maximales Pilzwachstum bedeutet jedoch nicht unbedingt maximale Aflatoxinproduktion, da Wachstumsoptimum und höchste Aflatoxinausbeute nicht zusammenliegen. Da außerdem nicht jede *Aspergillus flavus*-Art zur Aflatoxinsynthese befähigt ist, läßt sich nur in etwa 10 % aller verschimmelten Lebensmittel Aflatoxin nachweisen (HANSEN, 1971).

Die Optimaltemperatur für die Aflatoxinsynthese liegt bei 24° C (SCHINDLER, PALMER und EISENBERG, 1967). PETTIT und TABER (1968) stellten eine maximale Bildung von Aflatoxinen im Temperaturbereich von 25 - 35° C fest, bei einer Inkubation von 5 bis 10 Tagen.

Offenbar gibt es "sichere Temperaturen", bei denen keine Toxinproduktion stattfinden kann (SCHINDLER, PALMER und EISENBERG, 1967). Bei Aspergillen hört die Aflatoxinsynthese bei 13° C (DIENER und DAVIS, 1970), bei Penicilliumarten dagegen erst bei weniger als 4° C auf (HANSEN und HAGEDORN, 1969), wodurch eine gewisse Gefahr auch durch im Kühlschrank gelagerte Lebensmittel gegeben ist.

SCHROEDER und HEIN (1968) untersuchten den Einfluß von Temperaturschwankungen auf die Bildung von Aflatoxin durch *Aspergillus parasiticus*. Sie stellten fest, daß Abweichungen von der optimalen Temperatur (25° C) bei Erhöhungen auf 40 - 50° C einen hemmenden, Erniedrigungen bis 10° C dagegen keinen Einfluß auf die Toxinsynthese hatten. Die optimale relative Luftfeuchtigkeit für eine maximale Produktion von Aflatoxinen beträgt 89 - 95 %, wobei die Erdnußkerne einen Feuchtigkeitsgehalt von 23 - 34 % haben (PETTIT und TABER, 1968; ASHWORTH, SCHROEDER und LANGLEY, 1965). Allerdings setzt schon bei 10 - 12 % Substratfeuchte eine Aflatoxinsynthese ein (DIENER und DAVIS, 1970; HANSEN, 1971).

Außer Temperatur und Feuchtigkeit ist eine ausreichende Belüftung für eine starke Aflatoxinsynthese von Bedeutung (HAYES, DAVIS und DIENER, 1966; CINGLER et al., 1966). Daneben spielt auch der pH-Wert des Substrates eine Rolle. Pilzwachstum und Aflatoxin-Ausbeute sind im saueren Bereich größer als im neutralen oder schwach alkalischen (KIERNBERGER und GROLL, 1970b).

Der am häufigsten gebildete Aflatoxintyp scheint B₁ zu sein, wobei immer auch geringe Mengen B₂ nachzuweisen sind. Ein Schimmelpilzstamm, der nur G-Aflatoxine synthetisiert, konnte nicht gefunden werden (FRANK, 1968a).

2.2.2. Bildung von Aflatoxin M

ALLCROFT und CARNAGHAN (1962, 1963) entdeckten, daß in der Milch von Kühen, die mit toxischen Erdnüssen gefüttert worden sind, Substanzen auftreten, die bei Entenküken dieselben pathologischen Veränderungen hervorrufen wie die bekannten Aflatoxine. Dieses "Milchtoxin" (DE IONGH, VLIES und VAN PELT, (1964 a) wurde dem Medium entsprechend, in dem es erstmals entdeckt wurde, Aflatoxin M genannt (ALLCROFT et al., 1966). Es besteht aus den beiden Fraktionen M_1 und M_2 (HOTZAPFEL, STEYN und PURCHASE, 1966), die Derivate von Aflatoxin B_1 darstellen.

Es wurde zunächst vermutet, daß das "Milchtoxin" ausschließlich als Metabolit von Aflatoxin B im Organismus von Milchtieren gebildet wird. DE IONGH, VLIES und VAN PELT (1964a) fütterten Ratten mit isoliertem Aflatoxin B_1 und wiesen in der Rattenmilch das "Milchtoxin" nach. Da auch in der Rattenleber Aflatoxin M nachgewiesen werden konnte (ALLCROFT et al., 1966; BUTLER und CLIFFORD, 1965), lag die Vermutung nahe, daß die Umwandlung von B zu M in der Leber stattfindet. BUTLER und CLIFFORD (1965) beobachteten während der ersten beiden Stunden nach einmaliger Aflatoxindosierung leichte Abnahme der B_1 -Konzentration in der Leber bei Zunahme von M_1 . Da jedoch nach Ablauf dieser Zeit B_1 - und M_1 -Konzentration in gleichem Maße schwächer wurden, scheint keine vollständige Umwandlung von B_1 in M_1 in der Leber stattzufinden.

Außer in der Milch findet sich der Metabolit M in Harn, Nieren und Leber von Schafen (ALLCROFT et al., 1966), im Harn von Kühen (MASRI et al., 1967) und konnte neuerdings auch im Urin von Menschen nachgewiesen werden, die hochtoxische Erdnußbutter gegessen hatten (CAMPBELL et al., 1970).

In der Milch erscheint das Toxin M_1 12 bis 24 Stunden nach Aufnahme aflatoxinhaltigen Futters (VAN DER LINDE et al.,

1964, 1965) und ist drei bis vier Tage nach Beendigung der Aufnahme nicht mehr nachweisbar. Nach VAN DER LINDE, FRENS und VAN ESCH (1965) scheiden Kühe etwa 1 % der aufgenommenen Aflatoxinmenge mit der Milch aus. Nach MASRI et al. (1967) erscheint M_1 schätzungsweise zu 2 - 3 % der aufgenommenen B_1 -Menge in der Milch.

Schon DE IONGH, VLES und VAN PELT (1964a) stellten im R_F -Bereich, in dem sich das "Milchtoxin" darstellt, eine gleiche Violettfloreszenz in einem Extrakt einer Aspergillus-flavus-Kultur fest, die auf Erdnüssen gewachsen war. HOLZAPFEL, STEYN und PURCHASE (1966) isolierten Aflatoxin M_1 nicht nur von Schafharn, sondern auch von verschimmelten Erdnüssen. Nachdem Aflatoxin M_1 auch von verschimmeltem Reis isoliert werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß dieses Toxin weniger im tierischen Organismus neu synthetisiert wird, sondern vielmehr innerhalb der B_1 -Fraktion bereits vorgebildet ist (MASRI et al., 1967).

PURCHASE, STEYN und PRETORIUS (1968) untersuchten verschiedene Stämme aus der Aspergillus-flavus-Gruppe auf ihre Fähigkeit, Aflatoxin M zu bilden. Von 50 untersuchten Stämmen produzierten 14 Spuren, 27 größere Mengen Aflatoxin M neben unterschiedlichen Mengen der anderen Aflatoxintypen. Auch bei Züchtung von Aspergillus flavus auf Reis (STUBBLEFIELD, SHANNON und SHOTWELL, 1970) konnten Mengen von 20 - 25 mg M_1 und 2 - 3 mg M_2 /kg Substrat gewonnen werden. M-produzierende Stämme scheinen nach FRANK (1968a) nicht selten zu sein. Von 55 Stämmen aus der Aspergillus-flavus-Gruppe, isoliert von Muskatnuß, waren allein 17 in der Lage, ausschließlich Aflatoxin M zu synthetisieren.

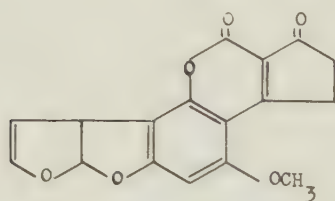
Ob die Aflatoxine M Zwischenprodukte bei der Bildung von B und G sind, oder ob diese Toxine bei der Einwirkung des Pilzes auf die schon gebildeten Aflatoxine B und G entstehen, ist nicht geklärt. Einerseits erscheint es unwahrscheinlich, daß ein Zwischenprodukt ein höheres Molekulargewicht als das

Endprodukt hat, andererseits fand aber auch keine Vermehrung von Aflatoxin M mit der Zeit statt (PURCHASE, STEYN und PRETORIUS, 1968).

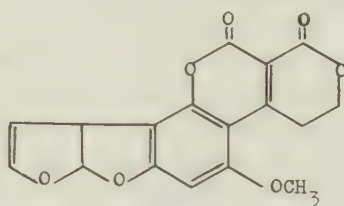
1.3. Aufbau der Aflatoxine

Die Aflatoxine stellen hochsubstituierte Coumarine dar. Die Strukturen der vier Grundtypen (Abb. 1) wurden durch verschiedene Forschergruppen aufgeklärt (ASAO et al., 1963, 1965; VAN DORP et al., 1963; CHANG et al., 1963; CHEUNG und SIM, 1964). Derivate dieser vier Grundtypen sind die übrigen bekannten Aflatoxine B_{2a} und G_{2a} (DUTTON und HEATHCOTE, 1966), M₁ und M₂ (HOIZAPFEL, STEYN und PURCHASE, 1966) sowie P₁ (DALEZIOS, WOGAN und WEINREB, 1971)(Abb. 2).

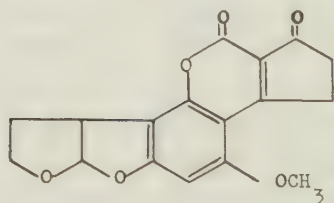
Abb. 1: Strukturformeln der Aflatoxin-Grundtypen



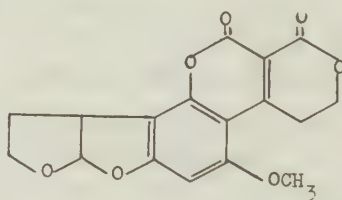
Aflatoxin B₁



Aflatoxin G₁

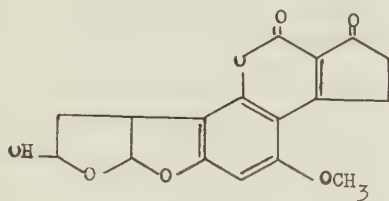


Aflatoxin B₂

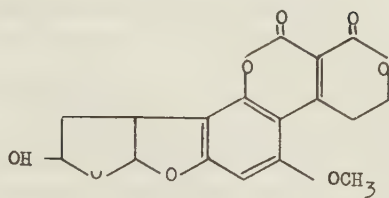


Aflatoxin G₂

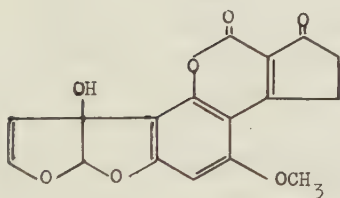
Abb. 2: Derivate der vier Aflatoxin-Grundtypen



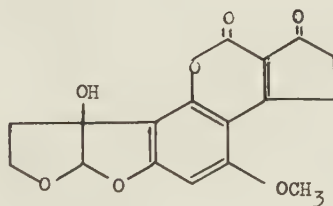
Aflatoxin B_{2a}



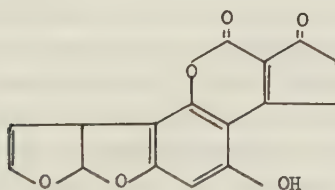
Aflatoxin G_{2a}



Aflatoxin M₁



Aflatoxin M₂



Aflatoxin P₁

Summenformeln und Molekulargewichte sind in Tabelle 1
zusammengefaßt.

Tabelle 1: Summenformeln und Molekulargewichte von Aflatoxinen.

Aflatoxin	Summenformel	Molekulargewicht
B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312
B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314
G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328
G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330
B _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330
G _{2a}	C ₁₇ H ₁₄ O ₈	346
M ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328
M ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330
P ₁	C ₁₆ H ₁₀ O ₆	298

2.4. P h y s i k a l i s c h e u n d c h e m i s c h e E i g e n s c h a f t e n d e r A f l a t o x i n e

Die Molekulargewichte der Aflatoxine sind verhältnismäßig klein und lassen daher keine Antikörperreaktion erwarten (BÖSENBERG, 1970). Infolge ihrer hohen Schmelzpunkte zwischen 190 und 310° C sind Aflatoxine relativ hitzestabil. Eine stärkere Toxininaktivierung kann erst bei Erhitzung über 100° C für längere Zeit und bei einem gewissen Feuchtigkeitsgehalt des kontaminierten Gutes festgestellt werden (MANN, CODIFER und DOLLAER, 1967). Da zur Verminderung der Toxinmenge durch Hitzeeinwirkung Feuchtigkeit notwendig ist, vermuten COOMES et al., (1966), daß die Detoxifizierung zunächst auf einer hydrolytischen Spaltung des Laktonrings beruht.

Aflatoxine fluoreszieren unter ultraviolettem Licht: B-Aflatoxine erscheinen als blauviolette, G-Aflatoxine als grünliche Fluoreszenzen und M-Aflatoxine fluoreszieren violett. Spektrometrische Daten der Aflatoxine sind zusammengefaßt bei BÖSENBERG (1970).

Aflatoxine sind in verschiedenen Lösungsmitteln und Lösungsmittelkompositionen löslich, unter anderem in Wasser, Aethanol, Methanol, Azeton-Wasser und Tetrahydrofuran. Am besten lösen sie sich in Chloroform; unlöslich sind sie in Hexan (KNAPSTEIN, 1967). In Lösungen, vor allem wäßrigen, und besonders im absorbierten Zustand, z.B. auf Säulen- oder Dünnschichtchromatogrammen, lassen sich Aflatoxine leicht durch Einwirkung von Luft, Licht und ultraviolettem Licht zerstören (WOGAN, 1966; KNAPSTEIN, 1967).

Eine Detoxifikation durch chemische Reaktionen erfolgt sofort mit 5 - 1, 25 %iger NaOCl- und 1 %iger KMnO_4 -Lösung (TRAGER und STOLOFF, 1967).

2.5. V o r k o m m e n d e r A f l a t o x i n e i n L e b e n s - u n d F u t t e r m i t t e l n

Natürliches Pilzwachstum mit Aflatoxinproduktion wurde außer auf brasilianischen Erdnüssen unter anderem auch auf Erdnüssen oder Erdnußextraktionsmehlen aus verschiedenen Gegenden Nordamerikas (DIENER et al., 1963), aus Ostafrika (ASPLIN und CARNAGHAN, 1961) und aus Israel (JOFFE, 1969) gefunden. Auch die Preßrückstände bei der Gewinnung von Erdnußöl, die zur Fütterung verwendet werden, können *Aspergillus flavus* und damit hochtoxische Substanzen beherbergen (SPENSLEY, 1963). Außer bei Erdnüssen und Erdnußprodukten besteht die Gefahr des Schimmelpilzbefalls mit Toxinbildung auch bei einer Reihe von anderen landwirtschaftlichen Erzeugnissen. So fanden LOOSMORE et al., (1964) toxinbildende Schimmelpilze auf Baumwollsaatkuchen.

Wenn auch in anderen Substraten natürliches Vorkommen des Toxins selten zu sein scheint (CIEGIELER und LILJENHOJ, 1968) und nach FRANK (1967) in der Hauptsache Preßkuchen tropischer und subtropischer Ölfrüchte, die Futtermitteln beigemengt werden, Träger der Giftstoffe sind, konnten auch in unseren Breiten in einigen verschimmelten Lebensmitteln Aflatoxine nachgewiesen werden. FRANK und EYRICH (1968) fanden Aflatoxine in Vollkornbrot und Weizenprodukten, darunter einem Diätetikum, daß nach vorgeschriebener Zubereitung mit Wasser spontan verschimmelt. HANSEN (1971) gibt einige Lebensmittel an, in denen er Aflatoxin B₁ nachweisen konnte. Es handelt sich dabei um Ölsamen, Obst und Früchte, Getreideerzeugnisse, Fleischwaren und Gewürze.

FRANK (1966) beimpfte mehrere Lebensmittel mit einem aflatoxinproduzierenden Aspergillus-Stamm und konnte damit zeigen, daß eine Toxinbildung auch in Lebensmitteln möglich ist, in denen sie bisher noch nicht festgestellt wurde. Er konnte Aflatoxine sowohl in geräuchertem Speck als auch in Rohwurst nachweisen, wenn auch auf tierischen Produkten wachsende Schimmelpilzstämme im Verhältnis zu auf Getreideprodukten gezüchteten nur wenig Toxin synthetisieren.

ALLCROFT und CARNAGHAN (1962, 1963) untersuchten Organe von Tieren, die mit aflatoxinhaltigem Futter gefüttert worden waren. Sie fanden das Toxin weder in Rinder- und Schweineleber noch in Hühnereiern. Das Hühnerei blieb auch nach Beimpfung mit Konidiensuspensionen aflatoxinfrei (FRANK, 1966).

Von Bedeutung für die Genußtauglichkeit eines verschimmelten Lebensmittels ist die Tatsache, daß die Toxine bei genügender Substratfeuchtigkeit in kleinerer oder größerer Menge aus dem Mycel in das Lebensmittel diffundieren (FRANK, 1968a; HANSEN und HAGEDORN, 1969). FRANK (1968b) stellte z.B. im Apfelsaft eine rasche Erhöhung des vom Mycel freien Aflatoxins fest.

Auch in Modellversuchen mit Vollkornbrot waren Aflatoxine bis zu 7 cm vom Pilzreflecht entfernt nachzuweisen (HANGSEN und HAGLDORN, 1969).

2.5.1. Aflatoxine in Milch und Milchprodukten

Milch und Milchprodukte können Aflatoxin infolge der Aufnahme verschimmelten Futters durch das Milchtier und zum Teil auch als Folge direkten Schimmelbefalls der Produkte enthalten. Kühe, die Aflatoxin B₁-kontaminiertes Futter aufgenommen haben, scheiden mit der Milch Aflatoxin M und geringe Mengen Aflatoxin B₁ aus (MASRI et al., 1967; JACOBSON, HARMEYER und **WISEMAN**, 1971), wobei die Toxine offenbar immer an die caseinhaltige Fraktion der Milch gebunden sind (ALLCROFT und CARNAGHAN, 1963; READ, 1966). Der Toxingehalt dieser Milch wird durch Pasteurisierung nicht vermindert, weder durch Hochkurzzeiterhitzung ("flash method") bei 72 - 77° C noch durch Dauererhitzung ("holding method") auf 63 - 66° C über 30 Minuten. Ebenso haben weder Gefriertrocknung noch Sprüh- und Walzentrocknung - bei den zwei letztgenannten werden Temperaturen von 70° C beziehungsweise 130° C erreicht - einen toxinvermindernden Effekt (ALLCROFT und CARNAGHAN, 1963). Die M₁-Mengen in gefrier- und walzengetrockneter Milch entsprachen in Untersuchungen von ALLCROFT und ROBERTS (1968) den in der Frischmilch nachgewiesenen.

ALLCROFT und CARNAGHAN (1963) untersuchten aus 11 verschiedenen Milchsammelstellen 19 Proben sprüh- oder walzengetrockneter Milch, die zur Herstellung von Handelsmilchprodukten verwendet werden. Es waren keine nachweisbaren Toxinmengen vorhanden, so daß sie vermuteten, daß durch das Sammeln der Milch von verschiedenen Erzeugerbetrieben im Endprodukt nur noch eine ungefährliche Toxinmenge enthalten ist, auch wenn die Milch einzelner Betriebe aflatoxinhaltig gewesen ist.

Eine nachträgliche Aflatoxinbildung in verpackt aufbewahrten Milchpulvern ist nicht zu erwarten, da Aflatoxin produzierende Schimmelpilze auf getrockneten Substraten nicht wachsen können (FRANK, 1968a). Bei Beimpfung des Milchpulvers und Inkubation unter entsprechenden Bedingungen (Erhöhung der Feuchtigkeit) kann jedoch Aflatoxin synthetisiert werden (FRANK, 1966; KIERMEIER, 1971).

Auf Käse wachsende Schimmelpilze können Aflatoxine in den Käse abscheiden. Zwar konnten in Untersuchungen verschiedener verschimmelter Käse aus Handel und Haushalt keine Aflatoxine nachgewiesen werden (FRANK und EYRICH, 1968; KIERMEIER und GROLL, 1970b), anhand von Modellversuchen konnte jedoch gezeigt werden, daß Aflatoxine auf Käse gebildet werden und in den Käse diffundieren können (FRANK, 1966; LIE und MARTH, 1967a, 1967b; KIERMEIER und GROLL, 1970b). Käsearten, die bei hoher Luftfeuchtigkeit längere Zeit im Käsereikeller lagern und währenddessen wiederholt von einer wilden Schimmelpilzflora befallen werden, sind besonders gefährdet (KIERMEIER, 1970).

Bei manchen Käsearten verhindert der Kulturschimmel, z.B. *Penicillium candidum* beim Camembert, das Wachstum von Aflatoxinbildnern (KIERMEIER und GROLL, 1970b). Nach diesen Autoren ist *Penicillium candidum* wie auch *Penicillium roqueforti* aus den Edelpilzkäsesorten zur Aflatoxinbildung nicht befähigt.

2.6. T o x i z i t ä t d e r A f l a t o x i n e

Als Maß für die akute Toxizität der einzelnen Komponenten gilt die Letaldosis für Eintagsentenküken. Danach besitzen die Aflatoxine B_1 und M_1 die größte und etwa gleiche Toxizität (CARNAGHAN, HARTLEY und O'KELLY, 1963; HOLZAPFEL, STEYN und PURCHASE, 1966; PURCHASE, 1967). B_1 ist etwa doppelt so giftig wie G_1 , und die beiden Dihydrofurane B_2 und G_2 haben eine um den Faktor 4,5 verringerte Toxizität gegenüber den Aflatoxinen B_1 und G_1 .

Tabelle 2: Akute Toxizität für Eintagsentenküken
nach BÖSENBERG (1970)

Aflatoxin	LD ₅₀ (7 Tage) in $\mu\text{g}/50\text{g}$ Entengewicht
B ₁	18,2
B ₂	84,8
G ₁	39,2
G ₂	172,5
B _{2a}	1200
G _{2a}	1600
M ₁	16,6
M ₂	62,0

Pathologische Veränderungen werden vor allem an der Leber sichtbar. Nekrosen im Leberparenchym und Proliferation der Gallengangsepithelien sind besonders ausgeprägt (BÖSENBERG, 1970). Daneben können Haemorrhagien der Nieren und des Verdauungstraktes sowie Nierennekrosen auftreten. (ASPLIN und CARNAGHAN, 1961; WOGAN, 1966).

Die karzinogene Wirkung der Aflatoxine wurde erstmals von LANCASTER, JENKINS und PHILP (1961) festgestellt. In Versuchen mit Ratten wurden nach der Aufnahme von Aflatoxin Lebertumoren und in einigen Fällen auch Lungenmetastasen diagnostiziert (LANCASTER, JENKINS und PHILP, 1961; BARNES und BUTLER, 1964; WOGAN, 1966). BUTLER und BARNES (1966) konnten durch Aflatoxin-Fütterung bei Ratten Magen- und Rektumkarzinome induzieren.

Auf der anderen Seite scheint Aflatoxin B₁ auch eine antineoplastische Wirkung zu besitzen (GREEN, 1968). Ratten, denen 24 Stunden nach einer tumorinduzierenden Substanz Aflatoxin B₁ injiziert worden war, bekamen zwar Neoplasien, überlebten aber länger als die Kontrolltiere ohne B₁-Injektion.

Die Applikation von Aflatoxinen in tragende Hamsterweibchen deckte die teratogene Eigenschaft der Aflatoxine auf (DI PAOLO, ELIS und ERWIN, 1967): Die Foeten waren mißgebildet, abgestorben oder resorbiert. Wenn den Muttertieren Aflatoxin B₁ nach Ausbildung der meisten fetalen Organe injiziert worden war, konnten die Veränderungen nicht beobachtet werden.

Das biochemische Wirkungsprinzip der Aflatoxine innerhalb des Organismus ist noch weitgehend unbekannt (BÖSENBERG, 1970). Geringe Konzentrationen reinen Toxins hemmen den Einbau von Leucin in Proteine und damit die Proteinsynthese (SMITH, 1963). Zellteilung und DNS-Synthese werden verhindert (LEGATOR, 1966), nach CLIFFORD und REES (1967a) als Folge der Hemmung der RNS-Polymerase einerseits und einer direkten Einwirkung der Aflatoxine auf die DNS andererseits. SPORN et al. (1966) sowie CLIFFORD und REES (1967b) nehmen eine direkte Bindung des Aflatoxins B₁ an die DNS an.

THERON, LIEBENBERG und JOUBERT (1965) fanden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen große Mengen roter Blutkörperchen im Cytoplasma der Leberzellen, in engem Kontakt mit degenerativ veränderten Mitochondrien und endoplasmatischem Reticulum. Sie vermuten daher, daß das Toxin mit den Erythrozyten an die Leberzellen herangetragen wird.

Als Ausdruck der gestörten Leberfunktion lassen sich im Serum vergifteter Tiere ein Anstieg der alkalischen Phosphatase und der Transaminasen sowie eine erhöhte Bilirubin-Konzentration nachweisen (CLIFFORD und REES, 1967a; GEDEK, 1970).

2.6.1. Toxizität der Aflatoxine für den Menschen

Die pathogene Wirkung der Aflatoxine auf den Menschen konnte noch nicht wissenschaftlich bewiesen werden (HANSEN, 1971). Die Toxizität der Schimmelpilzmetaboliten für Affen (TULPULÉ, MADHAVAN und GOPALAN, 1964) und Untersuchungen an menschlichen Zellkulturen lassen jedoch vermuten, daß der menschliche Organismus der Giftwirkung gegenüber ebenso empfindlich ist wie der tierische.

Schon geringe B_1 -Konzentrationen hemmen die DNS-Synthese und unterdrücken die Zellteilung menschlicher embryonaler Lungenzellen (LEGATOR und WITHROW, 1964; LEGATOR, ZUFFANTE und HOPF, 1965). Morphologische Abnormitäten wie Vakuolenbildung, Riesenzellbildung und Zellzerfall sind weitere Folgen der Toxinwirkung (LEGATOR, ZUFFANTE und HOPF, 1965).

Die akute Toxizität der Aflatoxine für menschliche Leberzellen entspricht etwa den LD_{50} -Werten für Eintagsentenküken. Menschliche Leberzellen sind dennoch weitaus empfindlicher, da schon bedeutend geringere Toxinkonzentrationen zytopathologische Veränderungen hervorrufen (ZUCKERMANN et al., 1967). Ebenso, wie in Rattenleberzellen, werden die DNS- und RNS-Synthese durch Aflatoxin B_1 gehemmt.

Akute Vergiftungen, wie sie bei Tieren nach Aufnahme großer Mengen aflatoxinhaltigen Futters vorkommen, werden beim Menschen kaum eine Rolle spielen, da der Mensch im allgemeinen verschimmelte Lebensmittel als genußuntauglich ablehnt (GIEDEK, 1968).

2.6.2. Toxizität der Aflatoxine für landwirtschaftliche Nutztiere

Die verschiedenen Tierarten reagieren unterschiedlich empfindlich auf Aflatoxine, und ausgewachsene Tiere sind resistenter gegen die Giftwirkung als junge (WOGAN, 1969). Da auf Grund der kurzen Lebensdauer der landwirtschaftlichen

Nutztiere mit einer Entwicklung von Leberkarzinomen nicht zu rechnen ist (GEDEK, 1970), sind hauptsächlich die akuten Vergiftungserscheinungen von Interesse.

Kälber

(LOOSMORE und MARKSON, 1961; ALLCROFT und LEWIS, 1963). Die akute Vergiftung äußert sich in verminderter Wachstumsrate, Appetitmangel, Stumpfsinnigkeit, Mahlen mit den Zähnen, starrem Blick, ruhelosem Laufen im Kreis, häufigem Hinfallen, Diarrhoe und kurz vor dem Tod Tenesmus, in vielen Fällen mit Rektumprolaps. Außerdem wird Anstieg der alkalischen Phosphatase im Serum und schließlich bis zum Tod wieder Abfall auf Normalwerte beobachtet.

Der pathologische Befund ergibt: Fibrose und Blässe der Leber, Gallengangsproliferationen, Aszites, Mesenterial-Ödem und zentrilobuläre Endophlebitis der Zentralvene. Chemisch wird fast völlige Verarmung der Leber an Vitamin A festgestellt.

Jungrinder im Alter von 1 1/2 bis 2 Jahren zeigen noch ähnliche klinische Erscheinungen und pathologische Leberveränderungen bei Vergiftung mit Aflatoxin (CLEGG und BRYSON, 1962), während bei 3 - 4 Jahre alten Tieren die Aufnahme von 15 - 20 % eines hochtoxischen Erdnußmehls in der täglichen Futterration über mehrere Monate zwar zu einem Abfall der Milchleistung führen kann (ALLCROFT und LEWIS, 1963), ohne daß die Tiere jedoch klinische Erscheinungen zeigen; sie kalben normal und bringen gesunde Kälber (ALLCROFT und LEWIS, 1963; A COMMERCIAL RESEARCH GROUP, 1964).

Die empfindlichsten landwirtschaftlichen Nutztiere, abgesehen vom Geflügel, scheinen Schweine im Alter zwischen 3 und 12 Wochen zu sein (BORKER et al., 1966). Von den ausgewachsenen Tieren erkranken hauptsächlich tragende Sauen an Aflatoxinvergiftungen. Schweine zeigen als einzige Tierart eine generalisierte Gelbsucht. Die Leber ist hell, weiß bis hellgelb, und subcutane Blutungen treten auf (HARDING et al., 1963).

Schafe scheinen resistent gegen eine Aflatoxin-Vergiftung zu sein (ALLCROFT et al., 1966). Die Verfütterung einer größeren Menge an Aflatoxin B₁ in der täglichen Ration über 3 Jahre führte zu keinerlei Vergiftungserscheinungen (ALLCROFT, 1965).

2.7. Lebens- und futtermittel- rechtliche Bestimmungen

Schon in kleinsten Mengen verursachen Aflatoxine morphologische und biochemische Veränderungen in menschlichen Zellen (LEGATOR und WITHROW, 1964; LEGATOR, ZUFFANTE und HOPKINS, 1965, ZUCKERMANN et al., 1967). Es muß befürchtet werden, daß sie die menschliche Gesundheit gefährden. In Anbetracht dessen sind in einigen Ländern zulässige Höchstgehalte an Aflatoxin für Lebensmittel, insbesondere Erdnüsse und Erdnußprodukte, festgesetzt worden. Innerhalb der Bundesrepublik Deutschland wird für Erdnüsse in einer ENTSCHEIDUNG DES **BAYERISCHEN** STAATSMINISTERIUMS (1965), ebenso wie in der Schweiz für Lebensmittel (HANSEN und HAGEDORN, 1969), kein nachweisbarer Aflatoxingehalt toleriert. In Großbritannien, Kanada (HANSEN und HAGEDORN, 1969) sowie den Niederlanden (STAATSBLED VAN HET KONINGRIJK DER **NEDERLANDEN**, 1966) wird Aflatoxin B₁ bis 5 µg/kg Lebensmittel zugelassen. In der NIEDERLÄNDISCHEN ERGÄNZUNGSVERORDNUNG zum Warengesetz (1966) ist es allerdings verboten, für den unmittelbaren Verbrauch bestimmte Erdnüsse, die nachweisbare Aflatoxinmengen enthalten, sowie Lebensmittel und Getränke, die unter Verwendung solcher Erdnüsse hergestellt worden sind, in Verkehr zu bringen.

Nach einer anonymen Mitteilung in der Zeitschrift Nature (1966) dulden FAO und WHO einen Höchstgehalt von 30 µg Aflatoxin/kg Lebensmittel, um der Gefahr der Unterernährung in vielen Ländern entgegenzuwirken.

Da für die Bundesrepublik Deutschland eine entsprechende Gesetzgebung fehlt, findet für Lebensmittel außer Milch § 3, Nr. 1 a des GESETZES ÜBER DEN VERKEHR MIT LEBENS- MITTELN UND BEDARFSGEGENSTÄNDEN (1969) und für Milch § 3, Nr. 1 f der 1. AVO ZUM MILCHGESETZ (1970) Anwendung. Die letztgenannte, im Rahmen dieser Arbeit relevante Vorschrift besagt: "Es ist insbesondere verboten, für andere zu gewinnen oder in den Verkehr zu bringen: Milch von Kühen, die mit Futtermitteln gefüttert wurden, welche die Beschaffenheit der Milch nachteilig für die menschliche Gesundheit beeinflussen können".

Im Hinblick darauf, daß Tiere über Futtermittel diese Giftstoffe aufnehmen können, die nicht nur die Tiere schädigen, sondern über Lebensmittel tierischer Herkunft auch auf den Menschen übergehen können, wurden für industrielle Futtermittel Grenzwerte für Aflatoxine festgelegt. In der Bundesrepublik Deutschland wird der zulässige Aflatoxingehalt in Mischfuttermitteln durch die ANORDNUNG ÜBER FUTTERMITTEL, MISCHFUTTERMITTEL UND MISCHUNGEN (1971) bestimmt. Mischfuttermittel für einige Jungtiere dürfen demnach keinen, Milchleistungsfutter dagegen einen Aflatoxingehalt bis zu 0,05 mg/kg und Ergänzungsfutter für Milchvieh bei Weidegang und Grünfütterung bis zu 0,15 mg/kg aufweisen.

Rechtliche Bestimmungen in Italien (RUNDSCHREIBEN Nr. 20 DES ITALIENISCHEN GESUNDHEITSMINISTERIUMS, 1967) verbieten die Verfütterung aflatoxinhaltiger Erdnußerzeugnisse an Jungtiere und laktierende weibliche Tiere. Aflatoxinhaltiges Futter muß in jedem Fall gekennzeichnet sein, so daß eine staatliche Kontrolle weitgehend gesichert ist.

2.8. Nachweismethoden

Von den zahlreichen verschiedenen Methoden zum Nachweis von Aflatoxinen wurden die meisten zur Analyse von Erdnüssen und Erdnußprodukten entwickelt. Zusammenstellungen

und Diskussionen der Untersuchungsprinzipien sind zu finden bei TRAGER, STOLOFF und CAMPBELL (1964), BORKER et al. (1966), MARTH (1967), SCOTT (1969) und BÖSENBERG (1970).

2.8.1. Chemische Nachweismethoden

Die Grundschrirte aller chemischen Methoden sind:

1. Vorbereitung der Probe,
2. Extraktion des Toxins,
3. Vorreinigung des Extraktes,
4. Chromatographische Auftrennung der Aflatoxine und
5. Identifizierung und Auswertung

(BORKER et al., 1966 ; KNAPSTEIN, 1967; SCOTT, 1969). Bei der Vorbereitung der Probe kommt es auf die Zerkleinerung und gründliche Durchmischung des Untersuchungsmaterials an. Die Extraktion wird auf zweierlei Weise durchgeführt, entweder in einem Soxhlet-Extraktor oder durch Ausschütteln mit verschiedenen Lösungsmitteln (BORKER et al., 1966).

Viele Autoren verwenden zur Extraktion Methanol, Methanol-Wasser-Gemische (NESBITT et al., 1962; BUTLER und CLIFFORD, 1965; FRANK, 1966; ALLCROFT und CARNAGHAN, 1963) oder Chloroform (NESBITT et al., 1962; HOLZAPFEL, STEYN und PURCHASE, 1966; FRANK und EYRICH, 1968; A.O.A.C. BOOK OF METHODS, eleventh edition). Nach BÖSENBERG (1970) enthalten Chloroform-Extrakte weniger Verunreinigungen, und die Aflatoxine bleiben in diesem Lösungsmittel besonders stabil. DE IONGH et al. (1964 b) empfehlen zur Erzielung besserer Resultate aufeinanderfolgende Extraktionen mit Methanol und Chloroform.

FRANK (1966) entwickelte außerdem ein Dialyseverfahren zum Aflatoxinnachweis, das auf alle bisher untersuchten Lebensmittel anwendbar ist.

Auch für die Vorreinigung werden hauptsächlich 2 Techniken angewandt: Die "Flüssig-flüssig-Abscheidung" und die Säulenchromatographie (BORKER et al., 1966).

Die Aflatoxine lassen sich mittels DC-Platte trennen, da sie mit verschiedenen Geschwindigkeiten wandern. Bei Entwicklung des Chromatogramms mit Chloroform-Methanol (97:3) erscheinen unter langwelligem UV-Licht fluoreszierende Flecken in unterschiedlichen R_F -Bereichen:

B_1	0,56
B_2	0,53
G_1	0,48
G_2	0,46

(WOGAN, 1966).

HOLZAPFEL, STEYN und PURCHASE (1966) ermittelten durch Papierchromatographie (Laufmittel Äthylacetat: Benzol 9:1) für Aflatoxin M_1 den R_F -Wert 0,34 und für M_2 den R_F -Wert 0,23. Die R_F -Werte sind schlecht reproduzierbar (WOGAN, 1966; KNAPSTEIN, 1967), da sie von verschiedenen Faktoren wie aufgetragener Probenmenge (FRANK, 1966) sowie Menge und Art der Begleitstoffe (KNAPSTEIN, 1967) abhängen.

Eine halbquantitative Bestimmung kann nun durch Intensitätsvergleich der aufgetragenen Probe und eines mitlaufenden Standards mit bekannter Aflatoxinkonzentration erfolgen oder durch Verdünnungen von Probe und Standard bis zur Sichtbarkeitsgrenze (BORKER et al., 1966; MARTH, 1967). Interner Standard, eine Mischung aus Vergleichsaflatoxin und Probenextrakt, und externer Standard, das Vergleichsaflatoxin, müssen stets mitlaufen, um die Identität der Flecken abzusichern (KNAPSTEIN, 1967; FRANK und EYRICH, 1968).

Statt der am meisten gebräuchlichen Dünnschichtchromatographie mit beschichteten Glasplatten verwenden einige Autoren die Papierchromatographie (COOMES und SANDERS, 1963; COOMES et al., 1964; SREENIVASAMURTHY, JAYARAMAN und PORPIA, 1964; HOLZAPFEL, STEYN und PURCHASE, 1966).

Als Laufmittel zur Entwicklung des Chromatogramms werden verschiedene Lösungsmittelgemische verwendet. FRANK (1969) empfiehlt, bei aflatoxinverdächtigen Proben nacheinander 8 verschiedene Fließmittel zu verwenden.

Andere Autoren empfehlen die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie, wodurch eine eventuell störende Hinterspur zu beseitigen ist (SCHULLER, VERHÜLSDONK und PAULSCH, 1970; KIERMEIER und GROLL, 1970 a).

Zur weiteren Sicherung der positiven Ergebnisse können Sprühreagentien verwendet werden, die mehr oder weniger spezifisch einen Farbumschlag der Aflatoxin-Fluoreszenzen bewirken, solche anderer Substanzen dagegen nicht verändern:

1. 50 %ige Schwefelsäure (SCHULLER et al., 1967; FRANK, 1969), die einen Farbumschlag der Aflatoxine nach gelb bewirkt. Diese Reaktion zeigen allerdings auch andere, nicht identifizierte Verbindungen, die nach FRANK (1969) aber nur selten beobachtet wurden.
2. Antimonchlorid in Chloroform (gesättigte Lösung), wobei Aflatoxin G₁ nach gelb umschlägt, B₁ aber unverändert bleibt.
3. 5 %ige Lösung von basischem Wismutnitrat in 5 %iger Salzsäure, ein Reagens für Aflatoxin B₁, das sich gelb-weiß darstellt. (FRANK und EYRICH, 1968; FRANK, 1969).

Erst, wenn eine Probe nach Verwendung der empfohlenen acht Fließmittel und drei Sprühreagentien ein standardgleiches Ergebnis zeigt, kann sie nach FRANK (1969) mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit als positiv gelten.

Die Ablesefehler beim visuellen Vergleich der Fluoreszenzintensitäten betragen bei geübten Personen 20 - 30 % (SCHULLER, VERHÜLSDONK und PAULSCH, 1970; JOST und NICOLET, 1969), nach Knapstein (1967) 15 - 20 %.

Genauer als der visuelle Intensitätsvergleich ist die Fluorodensitometrie (PONS, ROBERTSON und GOLDBLATT, 1966; AYRES und SINNHUBER, 1966; STUBBLEFIELD et al., 1967).

Eine Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der Aflatoxine bietet die von NABNEY und NESBITT (1964) vorgeschlagene UV-Absorptionsspektrometrie, deren Empfindlichkeitsgrenze bei 1 ppm Aflatoxin liegt. Exakte Ergebnisse werden durch die photofluorometrische Auswertung der Fluoreszenzen erzielt (TÓTH, TAUCHMANN und LEISTNER, 1970), wobei ein quantitativer Nachweis direkt von der DC-Platte erfolgen kann (LEISTNER, 1971).

Die genannten, in der Hauptsache für Erdnußprodukte und Baumwollsaat entwickelten Methoden lassen sich auf die übrigen Lebensmittel ohne weiteres anwenden (BORKER et al., 1966; FRANK und EYRICH, 1968).

Andere Autoren (ALLCROFT und ROBERTS, 1968; PURCHASE und STEYN, 1967; MASRI, PAGE und GARCIA, 1968; JACOBSON, HARMEYER und WISEMAN, 1971) haben zum Nachweis von Aflatoxin M in Milch und Milchpulvern Methoden modifiziert, die sich aber lediglich in den Extraktionsmitteln und -verfahren von den Nachweismethoden für die übrigen Aflatoxine unterscheiden.

2.8.2. Biologische Nachweismethoden

Zur Bestätigung des chemischen Aflatoxinnachweises können verschiedene biologische Verfahren angewendet werden. Ausgehend von der Empfindlichkeit von Eintagsentenküken gegenüber dem Toxin, entwickelten SARGEANT et al., (1961a) den "duckling test". Entenküken wird mittels einer Magensonde ein Extrakt aus dem aflatoxinhaltigen Material eingegeben. Auf Grund des Sterbens und der Leberveränderungen der Tiere wird eine Einteilung der Proben in stark, mittelstark, wenig toxisch oder negativ vorgenommen. Obwohl dieser Test

empfindlich ist, kann er doch nur zur Festigung der durch chemische Untersuchungen erzielten Ergebnisse herangezogen werden (MARTH, 1967), da für die auftretenden Leberveränderungen nicht mit Sicherheit andere Ursachen als Aflatoxinvergiftung auszuschließen sind (BÖSENBERG, 1970).

Um die Toxizität eines Extraktes zu bestimmen, kann auch die Empfindlichkeit mancher Bakterien, z.B. *Bacillus megaterium*, (BURMEISTER und HESSELTINE, 1966; JAYARAMAN, HERBST und IKAWA, 1968), von Zellkulturen (JUHÁSZ und GRECZI, 1964; LEGATOR, ZUFFANTE und HOPKINS, 1965) und Hühnerembryonen (JAYARAMAN, HERBST und IKAWA, 1968; KIERMEIER und BÖHM, 1971) genutzt werden.

Auf der Tatsache, daß Aflatoxine bei Pflanzen zu einer Chlorophyllverarmung führen (SCHOENTHAL und WHITE, 1965) beruht ein botanischer Test, den MAYER et al. (1969) zum raschen Nachweis von Aflatoxin M in Milch entwickelt haben.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material

166 Proben handelsüblicher Trockenmilchprodukte verschiedener Hersteller in der Bundesrepublik Deutschland wurden auf ihren eventuellen Gehalt an Aflatoxin M₁ geprüft. Das Untersuchungsmaterial setzte sich zusammen aus 22 Sprühvollmilchpulvern, 8 Walzenvollmilchpulvern, 38 Sprühmagermilchpulvern, 12 Walzenmagermilchpulvern, 56 diätetischen und Säuglingsmilchpulvern, 19 Futtermittelpulvern und 11 sonstigen, nicht näher bezeichneten Trockenmilcherzeugnissen, von denen die drei letztgenannten Gruppen ebenfalls nach dem Sprühverfahren hergestellt worden waren. Die Einteilung der unter den Nummern 1 - 134 und 139 - 170 im Institut für Milchkunde der Tierärztlichen Hochschule Hannover geführten Proben gibt Tabelle 3 wieder.

Tabelle 3: Übersicht über die untersuchten Proben
(nach KRAMPE, 1972)

- I Sprühvollmilchpulver
- II Walzenvollmilchpulver
- III Sprühmagermilchpulver
- IV Walzenmagermilchpulver
- V Diätetische und Säuglings-Milchpulver
- VI Futtermittelpulver
- VII Sonstige Trockenmilcherzeugnisse

I	<u>Proben Nr.</u>	II	<u>Proben Nr.</u>	III	<u>Proben Nr.</u>
	3 - 6		82 - 83		1 - 2
	20 - 21		97 - 102		7 - 8
	25 - 26				11 - 14
	57 - 58				22 - 24
	93 - 96				27
	149 - 150				59 - 62
	164 - 169				73
					88 - 89
IV	<u>Proben Nr.</u>	V	<u>Proben Nr.</u>		103 - 104
	15		9 - 10		107 - 112
	69 - 70		16 - 19		118 - 119
	74		29 - 56		143 - 144
	90		76 - 81		147 - 148
	105 - 106		124 - 134		156 - 159
	113		139 - 142		170
	145 - 146		151		
	154 - 156				
VI	<u>Proben Nr.</u>	VII	<u>Proben Nr.</u>		
	65 - 68		28		
	71 - 72		63 - 64		
	75		84 - 87		
	91 - 92		160 - 163		
	114 - 117				
	120 - 123				
	152 - 153				

3.2. Methode

Zur Untersuchung der Proben auf Aflatoxin M_1 wurde nach der Methode vorgegangen, die im Forschungslabor der H. Bahlsens Keksfabrik, Hannover (Leitung Dr. E. Hanssen), zur routinemäßigen Prüfung von Erdnüssen angewandt wird. Diese Methode entspricht im wesentlichen der amerikanischen Nachweismethode aus A.O.A.C. BOOK OF METHODS, eleventh edition.

Geräte

Schüttelmaschine, Vakuumrotationsverdampfer, DC-Ausrüstung mit Kammer, Glasplatten und Desaga-Streichgerät, UV-Lampe (Desaga, 366 nm); 500 ml Erlenmeyer Kolben mit Schliff, Glassäule (22 x 300 mm) mit Fritte und Hahn, Rundkolben mit Schliff (250 und 100 ml), Büchner-Trichter, Hamilton-Spritze, Bechergläser, Faltenfilter.

Reagentien

Kieselgur G, Chloroform p.a., wasserfreies Natriumsulfat, Kieselgel (Körnung 0,05 - 0,2 mm), n-Hexan rein, Diäthyläther, Methanol p.a., Benzol p.a., Acetonitril p.a., MN Kieselgel G-HR, Aceton, 50 %ige Schwefelsäure, Aqua dest. Aflatoxin M_1 - Standardlösung (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ werden 1 : 100 verdünnt)

Natriumhypochlorit zur Entgiftung der Geräte

Prinzip

- a) Extraktion der Aflatoxine aus dem Untersuchungsmaterial
- b) Reinigung des Extraktes mittels Säulenchromatographie
- c) Dünnschichtchromatographische Auftrennung der Aflatoxine

Extraktion

50 g Untersuchungsmaterial werden in einen 500 ml Erlenmeyer Kolben mit Schliff eingewogen und unter Zusatz von

25 ml destilliertem Wasser und 25 g Kieselgur mit 250 ml Chloroform 30 Min. auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Die Mischung wird filtriert oder, falls erforderlich, unter leichtem Wasserstrahlvakuum abgenutscht, wobei im Büchner-Trichter das Filterpapier mit einer etwa 5 mm hohen Schicht Kieselgur bedeckt ist.

Säulenchromatographie

50 ml des Filtrats werden zur Reinigung über eine Säule (22 x 300 mm) gegeben. Die Säule ist unten mit Fritte und Hahn ausgerüstet oder wird mit Glaswolle verstopft.

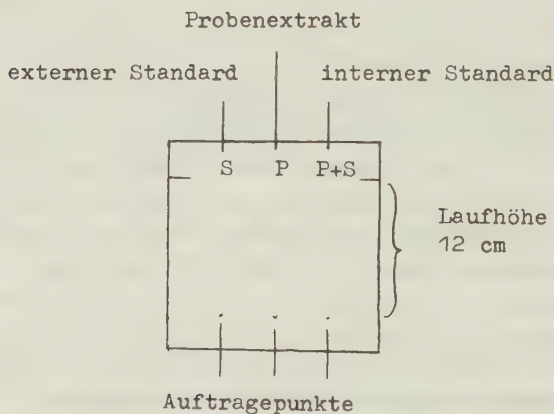
Zunächst werden 5 g wasserfreies Natriumsulfat eingefüllt, dann mit Chloroform die Säule etwa halb gefüllt. Darauf werden 10 g aktiviertes Kieselgel (Aktivierung: 2 Std. bei 105° C trocknen, danach Zugabe von 1 ml Aqua dest. auf 100 g Kieselgel), Körnung 0,05 - 0,2 mm, eingeschlämmt und die Wände mit Chloroform abgespült. Man rührt mit einem Glasstab um und läßt das Gel absitzen. Dann werden nochmals 15 g wasserfreies Natriumsulfat daraufgegeben, und das Chloroform läßt man soweit ablaufen, daß die Oberfläche der Säulenfüllung noch mit Chloroform bedeckt ist. Man läßt nun den das Aflatoxin enthaltenden Chloroform-Extrakt durch die vorbereitete Säule sehr schnell durchlaufen, wobei die Oberfläche der Säulenfüllung ebenfalls noch bedeckt bleiben muß. Dabei bleiben die Aflatoxine auf der Säule. Nun wird erst mit 150 ml n-Hexan, danach mit 150 ml Diäthyläther gewaschen (Oberfläche der Säulenfüllung bleibt jeweils bedeckt). Sodann werden die Aflatoxine mit 150 ml Methanol-Chloroform (3 : 97) eluiert (vollständig durchlaufen lassen). Vom Zeitpunkt der Methanol-Chloroform-Aufgabe wird die Fraktion in einem 250 ml Rundkolben gesammelt. Das Eluat wird am Vakuumrotationsverdampfer (oder Wasserbad) fast eingedampft, mit Chloroform in einen 100 ml Rundkolben überführt und zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 1 ml Benzol/Acetonitril (98 : 2) durch kräftiges Schütteln aufgenommen.

Dünnschichtchromatographie

Von dieser Lösung werden 25 μ l mit der Hamilton-Spritze punktförmig auf eine mit Kieselgel G-HR beschichtete Glasplatte aufgetragen (Schichtdicke 25 μ ; Aktivierung der Platte 1 Std. bei 105° C). Die Platte wird in einer Glas-
kammer mit Chloroform/Aceton (90 : 10) entwickelt. Bei einer Laufhöhe von 12 cm beträgt die Laufzeit etwa 30 Min..

Nachdem das Laufmittel abgedampft ist, wird die Platte unter UV-Licht betrachtet und beurteilt. Die Fluoreszenzen werden durch mitgelaufene Standardlösungen ^(x) (externer Standard = Vergleichsaflatoxin, interner Standard = Vergleichsaflatoxin + Probenextrakt) sowie durch Besprühen der Platte mit halbkonzentrierter Schwefelsäure identifiziert und ausgewertet.

Schema zur Vorbereitung des Chromatogramms



(^x Der aus den USA stammende Standard wurde uns dankenswerterweise durch Herrn Dr. E. Hanssen zur Verfügung gestellt.

3.3. Modellversuch

Einer schwarzbunten Kuh wurden nach dem Nachmittagsmelken mit der Nasenschlundsonde 1 kg aussortierte, zum Teil verschimmelte Erdnüsse eingegeben. Die Erdnüsse waren vorher in einem Starmix zerkleinert und mit Wasser vermischt worden. Der Gehalt der Erdnüsse an Aflatoxin B₁ betrug nach eigener Untersuchung ca. 1785 µg/kg.

Die Milch vom 1. (9,5 l), 2. (11 l) und 3. Tag (10,5 l) nach Verabreichung des Erdnußbreies wurde gesammelt und jeweils zwei Proben auf Aflatoxin M₁ untersucht. Die übrige Milch wurde drei Tage bei + 4° C gelagert und - nachdem die Trocknung aus technischen Gründen verschoben werden mußte - eingefroren und bei - 18° C aufbewahrt.

15 Tage nach Verabreichung der Erdnüsse wurde die eingefrorene Milch aufgetaut und nach dem Sprühverfahren, getrennt nach Tagen, getrocknet. Der erhaltene Frischzustand der Milch war zuvor mittels der doppelten Alkoholprobe bestätigt worden.

3.4. Ergebnisse

3.4.1. Ergebnisse aus den Untersuchungen von Trockenmilchprodukten

Von den 166 untersuchten Trockenmilchprodukten waren 8 Proben Aflatoxin-positiv, davon ein Säuglingsmilchpulver, 6 Sprühmagermilchpulver und 1 Walzenmagermilchpulver. Die positiven Proben und ihre durch Fluoreszenzvergleich ermittelten Aflatoxin M₁ -Gehalte sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Übersicht über die positiven Proben und die entsprechenden Toxingehalte

Milchpulver Proben Nr.	Aflatoxin M ₁ µg/kg
9	~ 0,7
11	~ 2,0
12	~ 1,3
143	~ 1,3
145	~ 2,0
147	~ 0,7
156	~ 1,3
157	~ 0,7

Nr. 9: Säuglingsnahrung

Nr. 11: Instant-Magermilchpulver vom Juli 1970

Nr. 12: Instant-Magermilchpulver vom Februar 1971

Nr. 143: Sprühmagermilchpulver vom Februar 1971

Nr. 145: Walzenmagermilchpulver vom Februar 1971

Nr. 147: Sprühmagermilchpulver vom April 1971

Nr. 156: Sprühmagermilchpulver

Nr. 157: Sprühmagermilchpulver

Die in einem Absatz zusammengefaßten Erzeugnisse stammen jeweils aus einem Herstellerbetrieb.

3.4.2. Ergebnisse aus dem Modellversuch

Der Milchprobenextrakt vom ersten Tag wies eine eindeutige, vom zweiten Tag eine zweifelhafte und vom dritten Tag keine Fluoreszenz im R_F-Bereich des Standards auf. Die daraus abgeleiteten Aflatoxingehalte sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Aflatoxingehalt der Milch nach Verfütterung von Erdnüssen

Tag nach Verfütterung	Aflatoxingehalt µg/l
1	~ 2,5
2	?
3	-

Mit dem Vorbehalt der Streubreite der Methode sind am ersten Tag nach Verfütterung des Erdnußbreies in 9,5 l Milch 23,8 µg M_1 ausgeschieden worden, also 1,3 % der eingegebenen Aflatoxin B_1 -Menge von 1785 µg.

In der sprühgetrockneten Milch vom ersten und zweiten Tag konnte Aflatoxin M_1 nachgewiesen werden. Die Trockenmilch vom dritten Tag enthielt keine nachweisbaren Aflatoxinmengen.

Tabelle 6: Aflatoxingehalt in der Trockenmilch

Tag nach Verfütterung	Aflatoxingehalt µg/kg
1	~ 15,0
2	~ 0,6
3	-

Die getrocknete Vollmilch, in der die Aflatoxine konzentriert enthalten sind, entspricht etwa 16,5 % der Frischmilch. 15 µg M_1 /kg Milchpulver vom ersten Tag nach Verfütterung der Erdnüsse sind daher einem Aflatoxingehalt von 2,5 µg M_1 /l Frischmilch gleichzusetzen, was bedeutet, daß durch das Trocknungsverfahren kein Aflatoxinverlust eingetreten ist.

Der Aflatoxin M_1 -Gehalt des Milchpulvers vom zweiten Tag entspricht etwa $0,1 \mu\text{g } M_1/\text{l}$ Frischmilch, so daß im gesamten Tagesgemelk von 11 Litern $1,1 \mu\text{g } M_1$ enthalten waren.

Insgesamt sind dann $24,8 \mu\text{g}$ Aflatoxin M_1 , also $1,4 \%$ der aufgenommenen B_1 -Menge von $1785 \mu\text{g}$, mit der Milch ausgeschieden worden.

Nachtrag zu 3.4.1.:

Die Proben Nr. 9, 11, 143 und 145, von denen noch ausreichende Mengen zur Verfügung standen, wurden von R.D. Stubblefield, United States Department of Agriculture, mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Purchase und Steyn, J. AOAC 50, 363-366 (1967), untersucht und densitometrisch ausgewertet. Die in den eigenen Untersuchungen erhaltenen positiven Ergebnisse wurden bestätigt. Im einzelnen wurden folgende Werte festgestellt:

Milchpulver Proben Nr.	Aflatoxin M_1 $\mu\text{g}/\text{kg}$
9	Spuren ($<0,4$)
11	0,5
143	1,8
145	1,4

4. DISKUSSION

Bei allen empfänglichen Tierarten sind insbesondere Jungtiere durch Aflatoxine gefährdet (WOGAN, 1969; GEDEK, 1970). Es kann daher angenommen werden, daß auch Säugling und Kleinkind in besonderem Maße einer Aflatoxin-Vergiftung zugänglich sind. Da Trockenmilchprodukte zu einem großen Teil als Säuglingsnahrung und zur Jungtieraufzucht verwendet werden, war es von besonderem Interesse, diese Lebens- und Futtermittel auf ihren Aflatoxin-Gehalt zu prüfen.

Wesentlich für die eigene Untersuchung waren die Aussagen von ALLCROFT und CARNAGHAN (1963) sowie ALLCROFT und ROBERTS (1968), daß weder Sprüh- noch Walzentrocknung einen toxinvermindernden Effekt auf aflatoxinhaltige Milch ausüben. Diese Untersuchungsergebnisse wurden in einem eigenen Modellversuch bestätigt. Der Aflatoxin-Gehalt von $15 \mu\text{g M}_1/\text{kg}$ der sprühgetrockneten Milch entspricht, unter Berücksichtigung der methodischen Streubreite, etwa dem in der Frischmilch nachgewiesenen von $2,5 \mu\text{g M}_1/\text{l}$.

Im übrigen liegen die Ergebnisse des Modellversuchs im Rahmen der Aussagen von VAN DER LINDE, FRENS und VAN ESCH (1965) sowie MASRI et al. (1967), da die mit der Milch ausgeschiedene Aflatoxin M_1 -Menge etwa 1,4 % der eingegebenen B_1 -Menge entspricht. Ebenso können die Aussagen von VAN DER LINDE et al. (1964, 1965) bestätigt werden,

daß Aflatoxin M 12 - 24 Stunden nach Aufnahme aflatoxinhaltigen Futters mit der Milch ausgeschieden wird und drei bis vier Tage nach der Fütterung nicht mehr nachweisbar ist.

Trockenmilchprodukte können nach den vorausgehenden Feststellungen, wenn sie aus aflatoxinhaltiger Milch hergestellt wurden, eine Gefahr für Mensch und Tier darstellen, auch wenn berücksichtigt werden muß, daß die Erzeugnisse nach Mischen mit Wasser erheblich geringere Toxinkonzentrationen enthalten. Nach ALLCROFT und CARNAGHAN (1963) ist die Wahrscheinlichkeit gering, daß Trockenmilchprodukte hohe Toxinmengen enthalten, da durch das Sammeln der Milch verschiedener Erzeuger in großen Tanks Aflatoxine in der Milch einzelner Betriebe auf Grund des Verdünnungseffektes nicht mehr nachweisbar sein werden. Die Autoren konnten dementsprechend in 19 Proben sprüh- oder walzengetrockneter Milch, die zur Herstellung von Handelsmilchprodukten verwendet werden, kein Aflatoxin nachweisen.

In eigenen Untersuchungen wurden dagegen von 166 Proben verschiedener Trockenmilchprodukte acht als Aflatoxin M_1 -positiv befunden. Das Ergebnis ist begründet durch R_F -Gleichheit von Probenextrakten und mitlaufenden M_1 -Standardlösungen, Intensivierung der Fluoreszenz des internen Standards sowie durch Farbumschlag der Fluoreszenzen nach gelb bei Besprühen mit halbkonzentrierter Schwefelsäure. Bei wiederholter Überprüfung der zunächst als aflatoxinverdächtig eingestuften Proben wurden dieselben Ergebnisse erzielt. Fehlerquellen durch kontaminierte Geräte sind auszuschließen, da alle benutzten Geräte nach jedem Gebrauch mit Natriumhypochlorit-Lösung (TRAGER und STOLOFF, 1967) detoxifiziert wurden.

In Anbetracht der Ergebnisse von ALLCROFT und CARNAGHAN (1963), daß nachweisbare Aflatoxinmengen in handelsüblichen Trockenmilchprodukten nicht vorhanden sind, stellt sich die

Frage nach der Zuverlässigkeit des bei den eigenen Untersuchungen angewandten Nachweisverfahrens (AOAC BOOK OF METHODS, eleventh edition). Dieses beruht auf der visuellen Auswertung von Chromatogrammen, bei der mit einem Ablesefehler von 15 - 20 % (KNAPSTEIN, 1967) oder sogar 20 - 30 % gerechnet werden muß (JOST und NICOLET, 1969; SCHULLER, VERHÜLSDONK und PAULSCH, 1970), und läßt daher keine sichere Bestimmung zu, zumal in den R_F -Bereichen der Aflatoxine, wenn auch selten (FRANK, 1969), nicht identifizierte Fluoreszenzen gleicher Art auftreten können, die mit Schwefelsäure ebenfalls durch einen Farbumschlag nach gelb reagieren. Es ist daher nicht auszuschließen, daß auftretende Fluoreszenzen Aflatoxin lediglich vortäuschen. Im allgemeinen wird die Methode, allein angewandt, nur dazu als geeignet angesehen, in Routineuntersuchungen Aflatoxin-verdächtige Proben festzustellen. Hierdurch wird ein Überblick über die mögliche Toxizität eines Lebensmittels geschaffen.

Zur entgeltigen Bestätigung des in der vorliegenden Arbeit ausgesprochenen Verdachts müßten weiterführende Untersuchungen wie biologische Tests (SARGEANT et al., 1961a; BURMEISTER und HESSELTINE, 1966; JAYARAMAN, HERBST und IKAWA, 1968; JUHASZ und GRECZI, 1964; LEGATOR, ZUFFANTE und HOPF, 1965; KIERMEIER und BÖHM, 1971; MAYER et al., 1969) und objektivere fluorodensitometrische Methoden (AYRES und SINNHUBER, 1966; PONS, ROBERTSON und GOLDBLATT, 1966; STUBBLEFIELD et al., 1967) oder sogar quantitative Bestimmungen der Aflatoxine durch photofluorometrische Auswertung der Fluoreszenzen (TOTH, TAUCHMANN und LEISTNER, 1970; LEISTNER, 1971) durchgeführt werden, was im Rahmen dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht möglich war. Eine gewisse Bestätigung, daß die in diesen Untersuchungen als positiv gewerteten Proben tatsächlich Aflatoxin enthalten, wurde durch Vergleichsuntersuchungen in einem anderen Laboratorium erhalten.

Hohe Toxinmengen in der Frischmilch eines Erzeugers mit großem Milchviehbestand oder das zufällige Zusammentreffen

von aflatoxinhaltiger Milch mehrerer Erzeuger könnten die Ursache dafür sein, daß entgegen den Mitteilungen oben zitierter Autoren Aflatoxine auch in handelsüblichen Trockenmilchprodukten nachgewiesen werden können. Es wäre z.B. denkbar, daß die Milchviehhalter eines oder mehrerer Dörfer dasselbe Kraftfutter über Genossenschaften beziehen, so daß über eine aflatoxinhaltige Futtermittelcharge ein erheblicher Teil der Milch des Einzugsgebietes einer Milchsammelstelle Aflatoxin enthalten kann.

Verantwortlich für die negativen Ergebnisse von ALLCROFT und CARNAGHAN (1963) dürfte auch die geringe Anzahl untersuchter Trockenmilchprodukte sein, denn selbst in den vorliegenden Untersuchungen war die große Spanne der Proben 13 - 142 Aflatoxin-negativ. Die Tatsache, daß acht Aflatoxin-positive Trockenmilcherzeugnisse aus nur drei von 24 Herstellerbetrieben stammten, weist einerseits auf regional bedingte Unterschiede hin und begründet andererseits die Notwendigkeit, möglichst umfangreiche Untersuchungen vorzunehmen, sofern über eine Produktgruppe eine zuverlässige Aussage gewünscht wird.

Eine nachträgliche Aflatoxin-Bildung in der Milch ist weitgehend auszuschließen. Es ist zwar bekannt, daß Aflatoxin M von einigen Schimmelpilzen direkt, von manchen sogar ausschließlich synthetisiert wird (DE IONGH, VLES und VAN PELT, 1964a; HOLZAPFEL, STEYN und PURCHASE, 1966; MASRI et al., 1967; PURCHASE, STEYN und PRETORIUS, 1968; STUBBLEFIELD, SHANNON und SHOTWELL, 1970; FRANK, 1968a), jedoch sind in der zur Trocknung vorgesehenen Milch ungünstige Wachstumsbedingungen für Schimmelpilze gegeben, zumal diese Milch sehr bald verarbeitet wird. Ob bei mangelnder Hygiene von Transportgefäßen, Leitungen, Sprühtürmen oder Walzenvorrichtungen Schimmelpilzwachstum auftritt, das für den Aflatoxingehalt in Trockenmilch verantwortlich sein könnte, erscheint ebenfalls zweifelhaft.

In Anbetracht der Gesundheitsschädlichkeit der Aflatoxine sollten gesetzliche Regelungen, die den Aflatoxingehalt in Lebensmitteln einschränken oder verbieten, nicht Ausnahme einzelner Länder (Schweiz, Großbritannien, Kanada, Niederlande, Bayern) bleiben und sich nicht auf Erdnüsse und Erdnußprodukte beschränken, nachdem die Gefahr der Intoxikation durch zahlreiche andere landwirtschaftliche Erzeugnisse und Lebensmittel bekannt ist.

Im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit ist auch die in Italien und neuerdings in der Bundesrepublik Deutschland getroffene Maßnahme sinnvoll, zur Vermeidung von Aflatoxinen in tierischen Produkten bei der Kontrolle der Futtermittel einzusetzen. Besonderer Wert ist hierbei auf die Kontrolle des Futters für Milchtiere zu legen, da Aflatoxine in die Milch übergehen und Aflatoxin M_1 ebenso toxisch ist wie B_1 (HOLZAPFEL, STEYN und PURCHASE, 1966; PURCHASE, 1967). Der Gehalt an Aflatoxinen in Handelsfuttermitteln sollte entweder verboten oder zumindest so limitiert sein, daß mit nachweisbaren Mengen an Aflatoxin M_1 in der Milch nicht mehr zu rechnen ist, was durch die ANORDNUNG ÜBER FUTTERMITTEL, MISCHFUTTERMITTEL UND MISCHUNGEN (1971) garantiert zu sein scheint. Allerdings ist auch zu bedenken, daß selbst bei einer intensiven Kontrolle industriell hergestellter Futtermittel nicht ausgeschlossen werden kann, daß betriebs-eigene Futtermittel infolge ungünstiger Gewinnungs- und Lagerungsbedingungen verschimmeln können. So kann auch das betriebseigene Futter aflatoxinhaltig sein. Aus diesem Grunde scheint die Kontrolle durch die Anordnung über Futtermittel, Mischfuttermittel und Mischungen allein nicht ausreichend zu sein, da durch sie lediglich Handelsfuttermittel erfaßt sind. Die Aflatoxinfreiheit der Lebensmittel Milch und Trockenmilch sollte durch Kontrolle der Produkte selbst weitgehend garantiert werden.

Zur Einhaltung lebens- und futtermittelrechtlicher Bestimmungen sind exakte quantitative Nachweismethoden notwendig.

Dazu bietet sich die photofluorometrische Auswertung der Fluoreszenzen an (TOTH, TAUCHMANN und LEISTNER, 1970), wobei ein quantitativer Aflatoxinnachweis direkt von der DC-Platte erfolgen kann (LEISTNER, 1971).

Da weder Pasteurisierung noch, wie in vorliegenden Untersuchungen bestätigt, Trocknung der Milch einen toxinvermindernden Effekt ausüben und aflatoxinhaltige Milch und Trockenmilchprodukte äußerlich unverändert sind, ist der Mensch durch diese Lebensmittel besonders gefährdet. Sie können hochtoxisch sein, vor allem, wenn man in Betracht zieht, daß Trockenmilch nicht nur verdünnt, sondern bei manchen Erzeugnissen auch in konzentrierterer Form verwendet wird.

Auch in Bezug auf die übrigen Lebensmittel sollte die Erkenntnis, daß Aflatoxine nicht nur im sichtbaren Schimmel vorhanden sind, sondern verschieden weit in Lebensmittel diffundieren können (FRANK, 1968a, 1968b; HANSEN und HAGEDORN, 1969) zu einer Aufklärung der Konsumenten führen, die meist nach Beseitigung verschimmelter Teile ein Lebensmittel unbedenklich für genußtauglich halten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

166 Proben handelsüblicher Trockenmilchprodukte (22 Sprühvollmilchpulver, 8 Walzenvollmilchpulver, 38 Sprühmagermilchpulver, 12 Walzenmagermilchpulver, 56 diätetische und Säuglingsmilchpulver, 19 Futtermittelpulver und 11 sonstige, nicht näher bezeichnete Trockenmilcherzeugnisse) aus insgesamt 24 Herstellerbetrieben wurden auf ihren Gehalt an Aflatoxin M_1 untersucht.

In insgesamt acht Proben (1 Säuglingsmilchpulver, 6 Sprühmagermilchpulver, 1 Walzenmagermilchpulver) aus drei verschiedenen Herstellerbetrieben ergab sich auf Grund der angewandten Methode (AOAC BOOK OF METHODS, eleventh edition) die hohe Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von Aflatoxin M_1 . Die ermittelten Toxingehalte von 0,7 - 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Trockenmilch sind insbesondere bei ständiger Verabreichung an Säuglinge, Kleinkinder und Jungtiere nicht unbedenklich.

Das Vorkommen von Aflatoxin M_1 in Milch und Trockenmilch ist auf die Verfütterung aflatoxinhaltigen Futters zurückzuführen. In einem Modellversuch konnten Untersuchungen anderer Autoren bestätigt werden; etwa 1,4 % der aufgenommenen Aflatoxin B_1 -Menge wurden als Aflatoxin M_1 mit der Milch ausgeschieden.

Bei Beachtung der nunmehr durch Rechtsvorschrift geregelten Aflatoxin-Höchstgehalte in Futtermitteln kann der Aflatoxin M_1 -Gehalt in Milch und Milchprodukten zwar weitgehend, im Hinblick auf betriebseigene Futtermittel jedoch nicht völlig unter Kontrolle gebracht werden. Die untersuchten Trockenmilchprodukte wurden vor dem Erlass entsprechender Vorschriften durch die Futtermittelanordnung hergestellt.

5. SUMMARY

166 samples of commercially available dried milk products (22 spray-dried and 3 roller-dried whole milk samples, 38 spray-dried and 12 roller-dried skim milk samples, 56 dietetic and babyfood samples, 19 feedstuff samples and 11 other unclassified samples) from a total of 24 producers were examined for their aflatoxin M_1 content with the method of A.O.A.C. (BOOK OF METHODS, eleventh edition).

8 samples (1 babyfood, 6 spray-dried skim milk and 1 roller-dried skim milk products respectively) from three different producers contained with high probability aflatoxin M_1 . Aflatoxin M_1 is in the detected amounts (0.7 - 2 μg Aflatoxin M_1 /kg dried milk) not harmless to babies, young children and young animals, if it is consumed regularly. The occurrence of aflatoxin M_1 in milk is caused by the application of feedstuff containing aflatoxins to dairy cows. A feeding test with ground-nuts confirmed the results of other investigators: approximately 1.4% of the total aflatoxin B_1 amount fed to a cow were excreted with the milk as aflatoxin M_1 . The drying process showed no effect on the aflatoxin M_1 concentration.

The aflatoxin M_1 quantities in milk (and dried milk) can be controlled with the new regulations limiting the aflatoxin content of feedstuff in the German Federal Republic with the exception that farmproduced feedstuffs are not subject of these regulations. The dried milk products which were analysed in this publication were produced just before the new standards for feedstuffs became effective.

6. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

ALLCROFT, R. (1965):

Aspects of aflatoxicosis in farm animals.

In "Mycotoxins in Foodstuffs" (G.N. Wogan ed.) MIT Press, Cambridge, Mass., 153 - 162.

ALLCROFT, R. und R.B.A. CARNAGHAN (1962):

Groundnut toxicity - *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products: preliminary communication.

Vet. Rec. 74, 863 - 864.

DIESELBEN (1963):

Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed toxic groundnut meal.

Vet. Rec. 75, 259 - 263.

ALLCROFT, R. und G. LEWIS (1963):

Groundnut toxicity in cattle: experimental poisoning of calves and a report on clinical effects in older cattle.

Vet. Rec. 75, 487 - 493.

ALLCROFT, R. und B.A. ROBERTS (1968):

Toxic groundnut meal: the relationship between aflatoxin B₁ intake by cows and excretion of aflatoxin M₁ in milk.

Vet. Rec. 82, 116 - 118.

ALLCROFT, R., R.B.A. CARNAGHAN, K. SARGEANT, und

J. O' KELLY (1961):

A toxic factor in Brazilian groundnut meal.

Vet. Rec. 73, 428 - 429.

ALLCROFT, R., H. ROGERS, G. LEWIS, J. NABNEY and P.E.

BEST (1966):

Metabolism of aflatoxin in sheep: excretion of the "milk toxin".

Nature 209, 154 - 155.

ANORDNUNG ÜBER FUTTERMITTEL, MISCHFUTTERMITTEL UND MISCHUNGEN (Futtermittelanordnung) vom 21.6.1949, geändert durch die Vierte Verordnung zur Durchführung des Gesetzes zur Änderung futtermittelrechtlicher Vorschriften vom 17.8.1971 (BGBl I, S. 1355).

AOAC BOOK OF METHODS, eleventh edition.

26. Natural Poisons,
26015 Method I, 429 - 430.

ASAO, T., G. BUCHI, M.M. ABDEL KADER, S.B. CHANG,
E.L. WICK und G.N. WOGAN (1963):
Aflatoxins B and G.
J. Am. Chem. Soc. 85, 1706 - 1707.

DIESELBEN (1965):
The structures of aflatoxins B₁ and G₁.
J. Am. Chem. Soc. 87, 882 - 886.

ASHWORTH, L.J.Jr., H.W. SCHROEDER und B.C. LANGLEY (1965):
Aflatoxins: environmental factors governing occurrence in Spanish peanuts.
Science 148, 1228 - 1229.

ASPLIN, F.D. und R.B.A. CARNAGHAN (1961):
The toxicity of certain groundnut meals for poultry with special reference to their effect on ducklings and chickens.
Vet. Rec. 73, 1215 - 1219.

AUSTWICK, P.K.C. und G. AYERST (1963):
Groundnut microflora and toxicity.
Chem. Ind. (London) 2, 55 - 61.

AYRES, J.L. und R.O. SINNHUBER (1966):
Fluorodensitometry of aflatoxin on thin-layer plates.
J. Am. Oil Chem. Soc. 43, 423 - 424.

- BARNES, J.M. und W.H. BUTLER (1964):
Carcinogenic activity of aflatoxin to rats.
Nature 202, 1016.
- BORKER, E., N.F. INSALATA, C.P. LEVI und J.S. WITZEMAN (1966):
Mycotoxins in feeds and foods.
Advances in Appl. Microbiol. 8, 315 - 351.
- BÖSENBERG, H. (1970):
Untersuchungen über den Nachweis von Aflatoxinen.
Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 1157 - 1167 und
1521 - 1528.
- BURMEISTER, H.R. und C.W. HESSELTINE (1966):
Survey of the sensitivity of microorganisms to aflatoxin.
Appl. Microbiol. 14, 403 - 404.
- BUTLER, W.H. und J.M. BARNES (1966):
Carcinoma of the glandular stomach in rats given diets
containing aflatoxin.
Nature 209, 90.
- BUTLER, W.H. und J.J. CLIFFORD (1965):
Extraction of aflatoxin from rat liver.
Nature 206, 1045 - 1046.
- CAMPBELL, T.C., J.P. CAEDO Jr., J. BULATAO-JAYME,
L. SALAMAT und R.W. ENGEL (1970):
Aflatoxin M₁ in human urine.
Nature 227, 403 - 404.
- CARNAGHAN, R.B.A., R.D. HARTLEY und J. O'KELLY (1963):
Toxicity and fluorescence properties of the aflatoxins.
Nature 200, 1101.

CHANG, S.B., M.M. ABDEL KADER, E.L. WICK und G.N.

WOGAN (1963):

Aflatoxin B₂: chemical identity and biological activity.
Science 142, 1191 - 1192.

CHEUNG, K.K. und G.A. SIM (1964):

Aflatoxin G₁: direct determination of the structure by
the method of isomorphous replacement.

Nature 201, 1185 - 1188.

CIEGLER, A. und E.B. LILLEHOJ (1968):

Mycotoxins.

Advances in Appl. Microbiol. 10, 155 - 219.

CIEGLER, A., R.E. PETERSON, A.A. LAGODA und H.H. HALL (1966):

Aflatoxin production and degradation by *Aspergillus flavus*
in 20-liter fermentors.

Appl. Microbiol. 14, 826 - 833.

CLEGG, F.G. und H. BRYSON (1962):

An outbreak of poisoning in store cattle attributed to
Brazilian groundnut meal.

Vet. Rec. 74, 992 - 995.

CLIFFORD, J.I. und K.R. REES (1967 a):

The action of aflatoxin B₁ on the rat liver.

Biochem. J. 102, 65 - 75.

DIESELBEN (1967 b):

The interaction of aflatoxins with purines and purine
nucleosides.

Biochem. J. 103, 467 - 471.

A COMMERCIAL RESEARCH GROUP (1964):

A summary of recent pig and cattle experiments with
toxic groundnut meal.

Vet. Rec. 76, 498 - 501.

COOMES, T.J. und J.C. SANDERS (1963):

The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials. Part I. Paper chromatographic procedure.

Analyst 88, 209 - 213.

COOMES, T.J., P.C. CROWTHER, A.J. FEUELL und

B.J. FRANCIS (1966):

Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin.

Nature 209, 406 - 407.

COOMES, T.J., P.C. CROWTHER, B.J. FRANCIS und

G. SHONE (1964):

The detection and estimation of aflatoxin in groundnuts and groundnut materials. Part. III. Classification of aflatoxin B₁ levels.

Analyst 89, 436 - 437.

DALEZIOS, J., G.N. WOGAN und S.M. WEINREB (1971):

Aflatoxin P₁: a new aflatoxin metabolite in monkeys.

Science 171, 584 - 585.

DIENER, U.L. und N.D. DAVIS (1970):

Limiting temperature and relative humidity for aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in stored peanuts.

J. Am. Oil Chem. Soc. 47, 347 - 351.

DIENER, U.L., N.D. DAVIS, W.D. SALMON und C.O. PRICKETT (1963):

Toxin-producing aspergillus isolated from domestic peanuts.

Science 142, 1491 - 1492.

DORP, D.A. VAN, A.S.M. VAN DER ZIJDEN, R.K. BERTHUIS,

S. SPARREBOOM, W.O. ORD, K. DE IONGH und R. KEUNING (1963):

Dihydroaflatoxin B₁ a metabolite of *Aspergillus flavus*.

Remarks on the structure of aflatoxin B.

Rec. Trav. Chim. 82, 587 - 592.

DUTTON, M.F. und J.G. HEATHCOTE (1966):

Two new hydroxyaflatoxins.

Biochem. J. 101, 21p - 22p.

ENTSCHLIEßUNG DES BAYERISCHEN STAATSMINISTERIUMS DES
INNERN (III 9-5056-7/65) betr. die Gesundheitsschädlich-
keit von mit *Aspergillus flavus* befallenen Erdnüssen vom
17.9.1965.

Ref.: Zschr. Lebensmittel-Unters. 130, 120 - 121 (1966).

ERSTE VERORDNUNG ZUR AUSFÜHRUNG DES MILCHGESETZES vom
15.5.1931, (RGL. I, S. 150).

FAO und WHO (1966):

Alarm about aflatoxin.

Ref.: Nature 212, 1512.

FRANK, H.K. (1966):

Aflatoxine in Lebensmitteln.

Arch. Lebensmittelhyg. 17, 237 -242.

FRANK, H.K. (1967):

Mykotoxine und ihre Produzenten.

Med. Klin. 62, 1933 - 1941.

FRANK, H.K. (1968a):

Occurrence, significance and testing method for aflatoxins
in dehydrated foods and feeds.

In Kampelmacher, E.H., M. Ingram und D.A.A. Mossel (1969):
The Microbiology of Dried Foods.

Proceedings of the sixth international symposium on food
microbiology.

Bilthoven, The Netherlands, June 1968

Grafische Industrie Haarlem, The Netherlands, 286 - 299.

FRANK, H.K. (1968b):

Diffusion of aflatoxins in foodstuffs.

J. Fd. Sci. 33, 98 - 100.

FRANK, H.K. (1969):

Nachweis von Aflatoxinen in Lebens- und Futtermitteln.

Alimenta 8, 67 - 69.

FRANK, H.K. und W. EYRICH (1968):

Über den Nachweis von Aflatoxinen und das Vorkommen

Aflatoxin-vortäuschender Substanzen in Lebensmitteln.

Zschr. Lebensmittel-Unters. 138, 1 - 11.

GEDEK, B. (1968):

Zur Bedeutung von Mykotoxinen für den Menschen.

Dtsch. Med. Wchschr. 93, 2397 - 2399.

DIESELBE (1970):

Zur schädigenden Wirkung stark keimhaltiger Futtermittel.

Tierärztl. Umschau 25, 335 - 342.

DIESELBE (1971):

Mykotoxine in Lebensmitteln und ihre Bedeutung für die Gesundheit des Menschen.

Mat. Med. Nordm. 23, 130 - 141.

GESETZ ÜBER DEN VERKEHR MIT LEBENSMITTELEN UND BEDARFS-
GEGENSTÄNDEN (Lebensmittelgesetz) vom 5.7.1927 .

In der Fassung des Gesetzes zur Änderung des Lebensmit-
telgesetzes vom 8.9.1969 (BGBl. I, S. 1590).

GREEN, S. (1968):

Antineoplastic activity of aflatoxin B₁.

Nature 220, 931 - 932.

HANSSSEN, E. (1971):

Über Aflatoxine.

Medizin und Ernährung 12, 249 - 259.

HANSSSEN, E. und G. HAGEDORN (1969):

Untersuchungen über Vorkommen und Wanderung von Aflatoxin B₁ und seine Veränderungen bei einigen lebensmitteltechnologischen Prozessen.

Zschr. Lebensmittel-Unters. 141, 129 - 145.

HARDING, J.D.J., J.T. DONE, G. LEWIS und R. ALLCROFT (1963):

Experimental groundnut poisoning in pigs.

Res. Vet. Sci. 4, 217 - 229.

HAYES, A.W., N.D. DAVIS und U.L. DIENER (1966):

Effect of aeration on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in submerged culture.

Appl. Microbiol. 14, 1019 - 1021.

HESELTINE, C.W., O.L. SHOTWELL, J.J. ELLIS und

R.D. STUBBLEFIELD (1966):

Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*.

Bacteriol. Rev. 30, 795 - 805.

HODGES, F.A., J.R. ZUST, H.R. SMITH, A.A. NELSON,

B.H. ARMBRECHT und A.D. CAMPBELL (1964):

Mycotoxins: aflatoxin isolated from *Penicillium puberulum*.

Science 145, 1439.

HOLZAPFEL, C.W., P.S. STEYN und I.F.H. PURCHASE (1966):

Isolation and structure of aflatoxins M₁ und M₂.

Tetrahedron Letters 25, 2799 - 2803.

IONGH, H. DE, R.K. BERTHUIS, R.O. VLES, C.B. BARRETT und

W.O. ORD (1962):

Investigation of the factor in groundnut meal responsible for "turkey X disease".

Biochim. Biophys. Acta 65, 548 - 551.

IONGH, H. DE, R.O. VLES und J.G. VAN PELT (1964 a):
Milk of mammals fed an aflatoxin-containing diet.
Nature 202, 466 - 467.

IONGH, H. DE, G.G. VAN PELT, W.O. ORD und C.B. BARRET (1964 b):
A semi-quantitative determination of aflatoxin B₁ in
groundnut meal, groundnuts, and peanut butter.
Vet. Rec. 76, 901 - 903.

JACOBSON, W.C., W.C. HARMEYER und H.G. WISEMAN (1971):
Determination of aflatoxins B₁ and M₁ in milk.
J. Dairy Sci. 52, 21 - 24.

JAYARAMAN, A., E.J. HERBST und M.J. IKAWA (1968):
The bioassay of aflatoxins and related substances
with *Bacillus megaterium* spores and chick embryos.
J. Am. Oil Chem. Soc. 45, 700 - 702.

JOFFE, A.Z. (1969):
Aflatoxin produced by 1 626 isolates of *Aspergillus flavus*
from groundnut kernels and soils in Israel.
Nature 221, 492.

JOST, R. und J. NICOLET (1969):
Aflatoxinanalysen von Futtermitteln: Ergebnisse und
Probleme.
Path. Microbiol. 33, 296 - 307.

JUHÁSZ, S. und E. GRÉCZI (1964):
Extracts of mold infested groundnut samples in tissue
culture.
Nature 203, 861 - 862.

KIERMEIER, F. (1970):
Zum Nachweis von Aflatoxinen in Käse.
Zschr. Lebensmittel-Unters. 144, 293 - 297.

KIERMEIER, F. (1971):

Zur Aflatoxinbildung in Milch und Milchprodukten.

Zschr. Lebensmittel-Unters. 146, 262 - 265.

KIERMEIER, F. und S. BÖHM (1971):

Zur Aflatoxinbildung in Milch und Milchprodukten.

Zschr. Lebensmittel-Unters. 147, 61 - 64.

KIERMEIER, F. und D. GROLL (1970 a):

Zur Bestimmung von Aflatoxin B₁ in Käse.

Zschr. Lebensmittel-Unters. 142, 120 - 123.

DIESELBEN (1970 b):

Zur Aflatoxin B₁-Bildung in Käsen.

Zschr. Lebensmittel-Unters. 143, 81 - 89.

KNAPSTEIN, H. (1967):

Bestimmung von Aflatoxin in Futtermitteln.

Landwirtschaftl. Forsch. 21, 164 - 171.

KRAMPE, F. (1972):

Erhebungen zur mikrobiologischen Beschaffenheit von
Trockenmilchprodukten.

Vet. Med. Diss., Hannover, in Vorbereitung.

LANCASTER, M.C., F.P. JENKINS und J. McL. PHILP (1961):

Toxicity associated with certain samples of groundnuts.

Nature 192, 1095 - 1096.

LEGATOR, M. (1966):

Biological effects of aflatoxin in cell culture.

Bacteriol. Rev. 30, 471 - 477.

LEGATOR, M.S. und A. WITHROW (1964):

Aflatoxin: effect on mitotic division in cultured
embryonic lung cells.

J. Ass. Off. Agric. Chem. 47, 1007 - 1009.

LEGATOR, M.S., S.M. ZUFFANTE und A.R. HORP (1965):
Aflatoxin: effect on cultured heteroploid human
embryonic lung cells.
Nature 208, 345 - 347.

LEISTNER, L. (1971):
Forschungsbericht: Untersuchungen über Mykotoxine, ins-
besondere Aflatoxine.
Institut für Bakteriologie und Histologie der Bundesan-
stalt für Fleischforschung, Kulmbach.

LIE, J.L. und E.H. MARTH (1967 a):
Development of aflatoxin in cheddar cheese.
J. Dairy Sci. 50, 955 - 956.

DIESELBEN (1967 b):
Formation of aflatoxin in cheddar cheese by *Aspergillus*
flavus and *Aspergillus parasiticus*.
J. Dairy Sci. 50, 1708 - 1710.

LINDE, J.A. VAN DER, A.M. FRENS und G.J. VAN ESCH (1965):
Experiments with cows fed groundnut meal containing
aflatoxin.
In "Mycotoxin in Foodstuffs" (G.N. WOGAN ed.)
MIT Press, Cambridge, Mass., 247 - 249.

LINDE, J.A. VAN DER, A.M. FRENS, H. DE IONGH und
R.O. VLES (1964):
Onderzoek van melk afkomstig van koeien gevoed met
aflatoxinehoudend grondnotenmeel.
Tijdschr. Diergeneesk. 89, 1082 - 1088.

LOOSMORE, R.M. und L.M. MARKSON (1961):
Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal.
Vet. Rec. 73, 813 - 814.

- LOOSMORE, R.M., R. ALLCROFT, E.A. TUTTON und
R.B.A. CARNAGHAN (1964):
The presence of aflatoxin in a sample of cottonseed cake.
Vet. Rec. 76, 64 - 65.
- MANN, G.E., L.P. CODIFER jr. und F.G. DOLLEAR (1967):
Effect of heat on aflatoxins in oilseed meals.
J. Agric. Fd. Chem. 15, 1090 - 1092.
- MARTH, E.H. (1967):
Methods for the qualitative and quantitative determination
of aflatoxins.
J. Milk Fd. Technol. 30, 317 - 320.
- MASRI, M.S., J.R. PAGE und V.C. GARCIA (1968):
Analysis for aflatoxin M in milk.
J. of the AOAC 51, 594 - 600.
- MASRI, M.S., R.E. LUNDIN, J.R. PAGE und V.C. GARCIA (1967):
Crystalline aflatoxin M₁ from urine and milk.
Nature 215, 753 - 755.
- MATELES, R.I. und J.C. ADAYE (1965):
Production of aflatoxin in submerged culture.
Appl. Microbiol. 13, 208 - 211.
- MAYER, A.M., A. POLIJAKOFF-MAYBER, P. ROBINSON und
J. SLOWATIZKY (1969):
A simple bioassay for detection of aflatoxin in milk.
Toxicon 7, 13 - 14.
- MISLIVEC, Ph.B., J.H. HUNTER und J. TUIITE (1968):
Assay for aflatoxin production by the genera *Aspergillus*
and *Penicillium*.
Appl. Microbiol. 16, 1053 - 1055.

NABNEY, J. und B.F. NESBITT (1964):

Determination of the aflatoxins.

Nature 203, 862.

NESBITT, B.F., J. O'KELLY, K. SARGEANT und A. SHERIDAN (1962):

Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*.

Nature 195, 1062 - 1063.

NIEDERLÄNDISCHE ERGÄNZUNGSVERORDNUNG zum Warengesetz vom
11. Juli 1966.

Ref.: Zschr. Lebensmittel-Unters. 134, 105 (1967).

PAOLO, J.A. DI, J. ELIS und H. ERWIN (1967):

Teratogenic response by hamsters, rats and mice to
aflatoxin B₁.

Nature 215, 638 - 639.

PARRISH, F.W., B.J. WILEY, E.G. SIMMONS und L. LONG jr.
(1966):

Production of aflatoxins and kojic acid by species of
Aspergillus and *Penicillium*.

Appl. Microbiol. 14, 139.

PETTIT, R.E. und R.A. TABER (1968):

Factors influencing aflatoxin accumulation in peanut
kernels and the associated microflora.

Appl. Microbiol. 16, 1230 - 1234.

PONS, W.A., J.A. ROBERTSON und L.A. GOLDBLATT (1966):

Objective fluorometric measurement of aflatoxins on
TLC plates.

J.Am. Oil Chem. Soc. 43, 665 - 669.

PURCHASE, I.F.H. (1967):

Acute toxicity of aflatoxin M₁ and M₂ in one-day-old
ducklings.

Ed. Cosmet. Toxicol. 5, 339 - 342.

PURCHASE, I.F.H. und M. STEYN (1967):

Estimation of aflatoxin M in milk.

J. of the AOAC 50, 363 - 366.

PURCHASE, I.F.H., M. STEYN und H.E. PRETORIUS (1968):

The production of aflatoxin M on various substrates.

Mycopathol. et Mycol. Applicata 35, 239 - 244.

READ, R.B. (1966):

Viruses and mycotoxins in milk - potential public health problems?

J. Dairy Sci. 49, 902 - 903.

RUNDSCHREIBEN Nr. 20 DES ITALIENISCHEN GESUNDHEITSMINISTERIUMS - Veterinärwesen - vom 3.2.1967, Nr. 600. 7/24315, AG/372.

zit. nach Hanssen, E. und G. Hagedorn (1969):

Untersuchungen über Vorkommen und Wanderung von Aflatoxin B₁ und seine Veränderungen bei einigen lebensmitteltechnologischen Prozessen.

Zschr. Lebensmittel-Unters. 141, 129 - 145.

SARGEANT, K., J. O'KELLY, R.B.A. CARNAGHAN und

R. ALLCROFT (1961 a):

The assay of a toxic principle in certain groundnut meals.

Vet. Rec. 73, 1219 - 1223.

SARGEANT, K., A. SHERIDAN, J. O'KELLY und R.B.A.

CARNAGHAN (1961 b):

Toxicity associated with certain samples of groundnuts.

Nature 192, 1096 - 1097.

SCHINDLER, A.F., J.G. PALMER und W.V. EISENBERG (1967):

Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to varied temperatures.

Appl. Microbiol. 15, 1006 - 1009.

SCHOENTHAL, R. und A.F. WHITE (1965):

Aflatoxins and "albinism" in plants.

Nature 205, 57 - 58.

SCHROEDER, H.W. und H. HEIN jr. (1967):

Aflatoxins: production of the toxins in vitro in relation to temperature.

Appl. Microbiol. 15, 441 - 445.

DIESELBEN (1968):

Effect of diurnal temperature cycles on the production of aflatoxin.

Appl. Microbiol. 16, 988 - 990.

SCHULLER, P.L., C.A.H. VERHULSDONK und W.E. PAULSCH (1970):

Bestimmung von Aflatoxin B₁ durch zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie mit fluorodensitometrischer Auswertung.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 20, 1517 - 1520.

SCHULLER, P.L., Th. OCKHUIZEN, J. WERRINGLOOR und

P. MARQUARDT (1967):

Aflatoxin B₁ und Histamin in Wein.

Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 17, 888 - 890.

SCOTT, P.M. (1969):

The analysis of foods for aflatoxins and other fungal toxins - a review.

J. Inst. Can. Technol. Aliment. 2, 173 - 177.

SCOTT, P.M., W. VAN WALBEEK und J. FORGACS (1967):

Formation of aflatoxins by *Aspergillus ostianus* Wehmer.

Appl. Microbiol. 15, 945.

SHOTWELL, O.L., C.W. HESSELTINE, R.D. STUBBLEFIELD und

W.G. SORENSEN (1966):

Production of aflatoxin on rice.

Appl. Microbiol. 14, 425 - 428.

SMITH, R.H. (1963):

The influence of toxins of *Aspergillus flavus* on the incorporation of (C^{14}) leucine into proteins.

Biochem. J. 88, 50p - 51p.

SPENSLEY, P.C. (1963):

Aflatoxin, das Gift der Truthahn-Krankheit.

Endeavor 22, 75 - 79.

SPORN, M.B., C.W. DINGMAN, H.L. PHELPS und G.N. WOGAN (1966):

Aflatoxin B_1 : binding to DNA in vitro and alteration of RNA metabolism in vivo.

Science 151, 1539 - 1541.

SREENIVASAMURTHY, V., A. JAYARAMAN und H.A.B. PORPIA (1964):

A rapid paper chromatographic method for detection of aflatoxin in groundnuts.

Indian J. Technol. 2, 415 - 416.

STAATSBLED VAN HET KONINKRIJK DER NEDERLANDEN (1966) S. 787.

zit. nach Hanssen, E. und G. Hagedorn (1969):

Untersuchungen über Vorkommen und Wanderung von Aflatoxin B_1 und seine Veränderungen bei einigen lebensmitteltechnologischen Prozessen.

Zschr. Lebensmittel-Unters. 141, 129 - 145.

STUBBLEFIELD, R.D., O.L. SHOTWELL, C.W. HESSELTINE,

M.L. SMITH und H.H. HALL (1967):

Production of aflatoxin on wheat and oats:

measurement with a recording densitometer.

Appl. Microbiol. 15, 186 - 190.

STUBBLEFIELD, R.D., G.M. SHANNON und O.L. SHOTWELL (1970):

Aflatoxins M_1 and M_2 : preparation and purification.

J. Am. Oil Chem. Soc. 47, 389 - 390.

THERON, J.J., N. LIEBENBERG und H.J.B. JOUBERT (1965):
Histochemistry and electron microscopy of acute liver
lesion induced by aflatoxin B₁ in ducklings.
Nature 206, 908 - 909.

TOTH, L., F. TAUCHMANN und L. LEISTNER (1970):
Fluorometrische Bestätigung des Nachweises von Aflatoxinen
in Routineuntersuchungen.
Fleischwirtschaft 50, 349 - 350.

TRAGER, W. und L. STOLOFF (1967):
Possible reactions for aflatoxin detoxification.
J. Agric. Food Chem. 15, 679 - 681.

TRAGER, W.T., L. STOLOFF und A.D. CAMPBELL (1964):
A comparison of assay procedures for aflatoxin in
peanut products.
J. Ass. Offic. Agric. Chem. 47, 993 - 1001.

TULPULÉ, P.G., T.V. MADHAVAN und C. GOPALAN (1964):
Effect of feeding aflatoxin in young monkeys.
Lancet 1, 962.

WILSON, B.J., T.C. CAMPBELL, A.W. HAYES und R.T. HANLIN (1968):
Investigation of reported aflatoxin production by fungi
outside the Aspergillus flavus group.
Appl. Microbiol. 16, 819 - 821.

WOGAN, G.N. (1966):
Chemical nature and biological effects of the aflatoxins.
Bacteriol. Rev. 30, 460 - 470.

WOGAN, G.N. (1969):
Alimentary mycotoxicoses.
In RIEMANN, H. (1969):
Food-Borne Infections and Intoxications.
Academic Press, 395 - 451.

ZIJDEN, A.S.M. VAN DER, W.A.A. KOELENSMID, J. BOLDINGH,
C.B. BARRETT, W.O. ORD und J. PHILP (1962):

Isolation in crystalline form of a toxin responsible
for turkey X disease.

Nature 195, 1060 - 1062.

ZUCKERMANN, A.J., K.R. REES; D. INMAN und V. PETTS (1967):

Site of action of aflatoxin on human liver cells in
culture.

Nature 214, 814 - 815.

Nachtrag zum Literaturverzeichnis:

1. AVO ZUM MILCHGESETZ

vom 15.5.1931 (RGL. I, S. 150),

in der Fassung vom 15.9.1970.

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. G. TERPLAN für die Überlassung des Themas und für seine jederzeit gern gewährte Anleitung und Unterstützung bei der Ausführung meiner Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Milchkunde der Tierärztlichen Hochschule Hannover für ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Herrn Dr. E. HANSSEN, Forschungsleiter der H. Bahlsens Keksfabrik, Hannover, gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Aflatoxinstandards.

Herrn Dr. E. HANSSEN, Frau M. JUNG und den Mitarbeiterinnen im Forschungslabor der H. Bahlsens Keksfabrik möchte ich außerdem für die Einweisung in die Untersuchungsmethode und jederzeit gern gewährte Auskünfte danken.

Lebenslauf

Ich, Annemarie Neumann-Kleinpaul, geb. Eggerss, wurde am 2.1.1945 als Tochter von Hans-Jürgen Eggerss und seiner Frau Edelgard, geb. Dee, in Nentershausen, Kreis Rotenburg, geboren.

Am 3.3.1965 schloß ich meine Schulzeit mit der Reifeprüfung an der Theodor-Fliedner-Schule, Kaiserswerth, ab. Im Sommersemester 1965 war ich ein Semester an der Ruprecht-Karl-Universität, Heidelberg, für das Fach Zoologie eingeschrieben. Im Wintersemester 1965/66 begann ich mein veterinärmedizinisches Studium an der Freien Universität, Berlin. Am 20.3.1968 bestand ich die Tierärztliche Vorprüfung und am 17.5.1971 den dritten Abschnitt der Tierärztlichen Prüfung. Am 11.6.1971 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.

